EIGENSCHAFTEN DES INSULINREZEPTORS IN ISOLIERTEN RATTENHEPATOCYTEN

Untersuchungen zur Struktur des Rezeptors und zur Internalisierung von Insulin und Rezeptor

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

KARL-NORBERT KLOTZ

aus Zizenhausen

1984

EIGENSCHAFTEN DES INSULINREZEPTORS IN ISOLIERTEN RATTENHEPATOCYTEN

Untersuchungen zur Struktur des Rezeptors und zur Internalisierung von Insulin und Rezeptor

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

KARL-NORBERT KLOTZ

aus Zizenhausen

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	20. 1. 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Eisele

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Wir sehen in der Natur nicht Wörter, sondern immer nur Anfangsbuchstaben von Wörtern, und wenn wir alsdann lesen wollen, so finden wir, daß die neuen sogenannten Wörter wiederum bloß Anfangsbuchstaben von andren sind.

Georg Christoph Lichtenberg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0011

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Weber durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Weber für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Rüdiger Koch danke ich für die vielen anregenden Diskussionen.

Meinen Laborkollegen Frau Uschi Heckel, Herrn Dipl. Biochem. Günter Müller, Herrn Dipl. Biochem. Reinhard Rapp und Herrn cand. biochem. Eberhard Trummer danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl. Biochem. Arno Deger, Herrn Dipl. Biochem. Sørge Kelm und Herrn cand. biochem. Helmut Krämer, durch deren unermüdlichen Einsatz der Umfang mancher Versuche erst zu bewältigen war. Herrn cand. biochem. Hans-Martin Jäck danke ich herzlich für seine hilfreiche Einweisung in den Gebrauch des Computerprogramms zur Analyse der Bindungsdaten, welches freundlicherweise von Herrn Dr. Dieter Schenzle (Institut für Medizinische Biometrie) bereitgestellt wurde.

Besonders dankbar bin ich meiner Frau Stephanie, die mir durch die selbstverständliche Übernahme häuslicher Verpflichtungen meine Arbeit sehr erleichtert hat.

A b s t r a c t

KLOTZ, KARL-NORBERT:

EIGENSCHAFTEN DES INSULINREZEPTORS IN ISOLIERTEN RATTENHEPATOCYTEN - Untersuchungen zur Struktur des Insulinrezeptors und zur Internalisierung von Insulin und Rezeptor

Für Strukturuntersuchungen wurde der Insulinrezeptor in Rattenhepatocyten photoaffinitätsmarkiert. Der markierte Rezeptor wurde mit Triton-X-100 aus den Zellen extrahiert und der Extrakt über Sepharose CL 6B gelfiltriert. Dabei wurde ein spezifischer Rezeptorpeak gefunden. Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnten ohne Reduktion vier Banden mit Molekulargewicht (MG) von 290.000 bis 390.000 aufgelöst werden, für deren enge strukturelle Beziehungen es Hinweise gibt. Nach Reduktion wurden zwei Banden mit MG 115.000 und 130.000 gefunden.

Durch die zeit- und temperaturabhängige Abnahme der Dissoziierbarkeit von zellgebundenem ^{125}J-Insulin wurde dessen Internalisierung nachgewiesen. Nach Photoaffinitätsmarkierung von Plasmamembranrezeptoren konnte auch die Internalisierung des kovalenten Insulin-Rezeptor-Komplexes nachgewiesen werden. Unmittelbar nach der Markierung konnten alle Plasmamembranrezeptoren durch Trypsin verdaut werden, während nach Weiterinkubation bei 37°C nur noch ein Teil der Rezeptoren zerstört werden konnte.

Durch Extraktion aller zellulärer Rezeptoren vor bzw. nach Trypsinverdauung konnte eine insulininduzierte Zunahme des intrazellulären Rezeptoranteils gefunden werden, die als Folge der Rezeptorinternalisierung anzusehen ist. Die internalisierten Rezeptoren werden durch Recycling zur Plasmamembran wiederverwertet, es konnte kein insulininduzierter Rezeptorabbau nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Rolle der Mikrotubuli bei der Internalisierung wurde Colchicin eingesetzt. Eine Inhibierung der Internalisierung konnte nicht beobachtet werden, dagegen führte Colchicin zu einer Akkumulation von Rezeptoren im Zellinnern. Dies wird durch eine Störung des Rezeptorrecyclings erklärt. Da auch in Abwesenheit von Insulin dieser Colchicineffekt auftrat, wird angenommen, daß auch in Abwesenheit von Hormon ein basaler Rezeptorturnover stattfindet.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Struktur des Insulinrezeptors	2
1.2.	Rezeptorvermittelte Endocytose von Insulin	5
1.3.	Frisch isolierte Hepatocyten als experimentelles System	10
2.	ABKÜRZUNGEN UND SCHREIBWEISEN	12
3.	MATERIAL UND METHODEN	14
3.1.	Chemikalien, Biochemikalien	14
3.2.	Verbrauchsmaterial	16
3.3.	Versuchstiere	16
3.4.	Geräte	16
3.5.	Präparation von MABI und DABI	18
3.6.	Jodierung von Insulin mit ^{125}J	19
3.7.	Präparation von Membranen, Membranextrakt und CON A-Eluaten aus Rattenleber	21
3.7.1.	Lebermembranen und Tritonextrakt	21
3.7.2.	CON A-Eluat	21
3.8.	Isolierung von Rattenhepatocyten	21
3.9.	Präparation von Membranen und Membranextrakt aus isolierten Hepatocyten	24
3.10.	Rezeptorextrakte und CON A-Eluat aus isolierten Hepatocyten	25
3.10.1.	Tritonextrakt	25
3.10.2.	CON A-Eluat	26
3.10.3.	Octylglucoseextrakt	26
3.11.	Bindungsstudien	27
3.11.1.	Inkubation von Tritonextrakten bzw. CON A-Eluaten mit ^{125}J-Insulin	27
3.11.2.	Inkubation von Lebermembranen mit ^{125}J-Insulin	28

Seite

3.11.3. Inkubation von Hepatocyten 28
3.11.3.1. Assoziation von ^{125}J-Insulin oder ^{125}J-MABI 29
3.11.3.2. Dissoziationsversuche 30
3.11.3.3. Allgemeines zum Zentrifugieren von Hepatocyten 32
3.11.4. Auswertung von Bindungsdaten 32
3.12. Trypsinverdauung von Hepatocyten 33
3.13. Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors in Hepatocyten 34
3.14. Gelfiltration des markierten Insulinrezeptors 34
3.15. Bestimmung des Insulinabbaus 35
3.16. SDS-PAGE des Insulinrezeptors 36
3.17. Autoradiographie 38
3.18. Proteinbestimmung 38
3.19. Darstellung von Meßergebnissen 38

4. ERGEBNISSE 39
4.1. Bindung von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten 39
4.1.1. pH-Abhängigkeit 39
4.1.2. Assoziation von ^{125}J-Insulin bei verschiedenen Temperaturen 41
4.1.3. Dissoziationskonstanten des Insulin-Rezeptor-Komplexes 44
4.2. Dissoziation von zellgebundenem ^{125}J-Insulin 46
4.3. Abbau von ^{125}J-Insulin durch Hepatocytensuspensionen 50
4.4. Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors 56
4.4.1. Darstellung und Eigenschaften von MABI und DABI 56
4.4.2. Markierungsversuche mit ^{125}J-MABI und ^{125}J-DABI 57
4.4.3. Zellfraktionierung nach Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors 58

Seite

4.5. Struktur des photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptors in Hepatocyten 61
4.5.1. Gelfiltration des Rezeptors 61
4.5.2. SDS-PAGE des Rezeptors 65
4.6. Kovalente Insulin-Rezeptor-Bindung 70
4.7. Internalisierung von ^{125}J-Insulin 71
4.7.1. Inhibitoren der Internalisierung 72
4.7.1.1. Transglutaminaseinhibitoren 72
4.7.1.2. Phenylglyoxal, ein Argininreagens 73
4.7.1.3. Zerstörung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli 73
4.7.1.4. Effekte der getesteten Substanzen auf Bindung und Abbau von ^{125}J-Insulin 76
4.7.2. Temperaturabhängigkeit 84
4.8. Intrazelluläre Rezeptoren 84
4.8.1. Effekt von Insulin auf die zelluläre Rezeptorverteilung 87
4.8.2. Effekt von Colchicin auf die zelluläre Rezeptorverteilung 88
4.9. Internalisierung des photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptors 94
4.10. Rezeptorabbau 95

5. DISKUSSION 106
5.1. Eigenschaften der Insulinbindung in Hepatocytensuspensionen 106
5.1.1. Bindung von ^{125}J-Insulin 106
5.1.2. Insulinabbau 109
5.1.3. Dissoziation 110
5.2. Struktur des Insulinrezeptors in Hepatocyten 111
5.2.1. Gelfiltration 111
5.2.2. SDS-PAGE 111
5.3. Internalisierung von Insulin und Rezeptor 116
5.3.1. Dissoziationsexperimente zum Nachweis der Internalisierung von Insulin 116

Seite

5.3.2. Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes 117
5.3.3. Mechanismus der Internalisierung 119
5.3.4. Intrazelluläre Rezeptoren 120
5.4. Rezeptorregulation 121
5.4.1. Schicksal des internalisierten Rezeptors 121
5.4.2. Effekt von Colchicin 124
5.4.3. Rezeptorturnover 127

6. ZUSAMMENFASSUNG 129

7. LITERATUR 132

1. EINLEITUNG

Die biologische Wirkung von Hormonen wird dadurch vermittelt, daß die Zellen der Zielgewebe Hormonrezeptoren besitzen, die Hormonmoleküle mit hoher Spezifität und Affinität binden können. Für hydrophile Hormone wie Insulin, Glukagon oder Adrenalin, die nicht in die Zelle eindringen können, sitzen die Rezeptoren in der Plasmamembran, während sie für die lipophilen Steroidhormone, die die Plasmamembran passieren können, im Cytosol zu finden sind.

Insulinrezeptoren konnten in einer Vielzahl tierischer Gewebe nachgewiesen werden (11, 17, 50, 53, 84, 102, 104, 112, 201, 225, 240, 315, 324) und sind seit über zehn Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Dieses Interesse liegt darin begründet, daß die Bindung von Insulin an seinen Rezeptor der erste Schritt in der noch wenig verstandenen Wirkungskette ist, die zur Auslösung der vielfältigen metabolischen Effekte von Insulin führt. Die Bemühungen konzentrieren sich auf die Strukturaufklärung des Rezeptors, die Untersuchung der Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes und des anschließenden Schicksals von Ligand und Rezeptor und die Suche nach Mechanismen der Signalübertragung. Im folgenden soll ein kurzer Überblick über den Wissensstand in den Punkten gegeben werden, die im Rahmen dieser Arbeit von Interesse sind. Für den Themenkreis Signalübertragung von Insulin sei auf die Übersichtsartikel (56, 58, 69, 114, 206, 327) und die jüngsten Arbeiten (174, 212, 319, 344) verwiesen.

1.1. Struktur des Insulinrezeptors

Die Isolierung von Insulinrezeptoren als klassischer Weg zur Strukturaufklärung und auch zur Untersuchung von Insulin-Rezeptor-Wechselwirkungen ist ein allenfalls unbefriedigend gelöstes Problem (92, 108, 154, 164, 230, 299, 337). Eine Reihe von Schwierigkeiten, wie z.B. extrem kleine Konzentrationen im Ausgangsmaterial, Denaturierung während der Isolierung und die Löslichkeit nur in Gegenwart von Detergentien, stehen einer Gewinnung gereinigten Materials im Wege. Viele Untersuchungen werden daher mit isolierten Membranen (46, 53, 99, 164, 197, 224) oder rohen Rezeptorpräparationen, die durch Extraktion des Insulinrezeptors aus Membranan mit nichtionischen Detergentien wie Triton-X-100 gewonnen werden, vorgenommen (52, 53, 107, 191, 197, 224, 225, 265). Weitere Reinigung des Rezeptors durch Gelfiltration (107, 141, 171, 191, 224, 226, 333), Chromatographie über CON A-Sepharose (54, 171, 191, 233, 333) oder die Fällung mit CON A und die anschließende Elution aus dem Pellet mit α-Methyl-Mannose (176, 190) stellen einfache Methoden dar, um mit wenig Aufwand angereicherte und von Insulinabbauaktivität befreite "Rezeptorlösungen" zu erhalten.

Für Strukturuntersuchungen stellt sich das Problem der Rezeptorreinigung nicht mehr, seit durch Einführung der Photoaffinitätsmarkierung (157, 200, 336, 338, 339, zur Methode allgemein s. 16, 44, 60, 163) und der Vernetzung von rezeptorgebundenem ^{125}J-Insulin mit bifunktionellen Reagenzien wie Disuccinimidyl-Suberat (97, 172, 257) Techniken angewandt wurden, den Insulinrezeptor in Lösung, in Membranen oder in intakten Zellen spezifisch zu markieren. Nachdem Antikörper gegen den Insulinrezeptor zur Verfügung standen (93, 156, 167), konnte der Rezeptor nach direkter Jodierung mit ^{125}J (138, 159, 173, 205) oder nach biosynthetischer Markierung mit ^{35}S (173, 318) oder tritiierten Zuckern (140) durch Immunpräzipitation aus einem Proteingemisch abgetrennt werden, sodaß auch auf diesem Weg Ausgangsmaterial für Strukturuntersuchungen gewonnen werden konnte.

Die mit einer dieser Techniken radioaktiv markierten Insulinrezeptoren wurden durch SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie der getrockneten Gele untersucht. In nichtreduzierten Systemen wurden von den verschiedenen Autoren bis zu vier Rezeptorbanden gefunden, deren Molekulargewichte etwa zwischen 260.000 und 400.000 liegen (21, 157, 178, 191, 192, 221-223, 258) (zu der von Koch et al. (192) beschriebenen fünften Bande vom Molekulargewicht 245.000 siehe 5.2.2.).

Nach Reduktion der Rezeptorproben wurde von den meisten Autoren eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht im Bereich von 120.000 - 130.000 (15, 21, 89, 138, 140, 146, 154, 157, 173, 178, 192, 221, 223, 257, 258, 260, 318, 329, 336, 339-342), von vielen wurden weitere, weniger intensive Banden mit Molekulargewichten von etwa 90.000 und/oder 40.000 - 50.000 gefunden (15, 21, 138, 140, 146, 157, 173, 178, 221, 223, 266, 318, 340-342). Weitere Banden, die nur vereinzelt gefunden wurden (15, 89, 138, 140, 173, 178), sollen in dieser Betrachtung außer acht bleiben.

Aus diesen und mit anderen Methoden gewonnenen Daten wurden verschiedene Rezeptormodelle erstellt (57, 107, 135, 222, 224), wobei das von Massagué et al. (57, 222) vorgeschlagene Tetramermodell allgemein Beachtung gefunden hat. Danach soll jedes Rezeptormolekül aus zwei α-Ketten (MG 125.000) und zwei β-Ketten (MG 90.000) über Disulfidbrücken in der Form β-α-α-β verknüpft sein. Die β-Untereinheit wurde auch in einer Form β_1 (MG 49.000) gefunden, die durch proteolytische Abspaltung eines Teilstücks entstehen soll (57, 160, 223). Da die Abspaltung an den beiden β-Untereinheiten nacheinander erfolgen kann, erklärt sich, daß in der SDS-PAGE ohne Reduktion drei Rezeptorbanden gefunden wurden (21, 57, 222). Die sinnfällige Analogie zur Struktur der Immunglobuline hat sicher einen Beitrag zur Favorisierung dieses Modells geleistet. Da aber bei weitem nicht alle experimentellen Befunde mit diesem Modell in Einklang zu bringen sind (173, 178, 191, 192, 200, 204, 205), wurden in

jüngster Zeit von anderen Autoren ähnliche (266) oder deutlich abweichende Strukturvorschläge (15, 342) für den Insulinrezeptor gemacht.

Aufgrund der Wechselwirkungen von Lectinen wie CON A und WGA mit dem Insulinrezeptor war schon lange bekannt, daß es sich um ein Glycoprotein handelt (30, 31, 34, 43, 54, 55, 67, 139, 211). Weitere Indizien ergaben sich aus dem veränderten Laufverhalten in der SDS-PAGE nach Behandlung mit Neuraminidase oder anderen Glycosidasen (137, 158, 318, 341, 342). Ferner wurde gezeigt, daß die Rezeptorbiosynthese durch Tunicamycin, einem Inhibitor von Glycosylierungsreaktionen (85), inhibiert wird (277, 281, 283, 304). Galaktose, Mannose, Glucosamin und Fucose konnten durch Einbau der tritiierten Zucker direkt als strukturelle Bestandteile nachgewiesen werden (140).

Die vielfältigen Ergebnisse zur Struktur des Insulinrezeptors können eine Reihe von Ursachen haben. Einerseits können Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben oder Spezies vorliegen, andererseits können unterschiedliche Markierungstechniken oder strukturelle Veränderungen (Disulfidspaltung oder -austausch, Proteolyse, Abspaltung von Zuckerresten) des Rezeptors während der Präparation verantwortlich sein. Inwieweit strukturelle Veränderungen durch Extraktion und Anreicherung (65, 178, 191, 192) im Vergleich zum Rezeptor in isolierten Hepatocyten eintreten, war eine Fragestellung für die Strukturuntersuchungen in dieser Arbeit. Der Frage nach der Struktur kommt außerdem Bedeutung zu im Rahmen der zur Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes und seines anschließenden Schicksals gemachten Versuche.

1.2. Rezeptorvermittelte Endocytose von Insulin

Die Bindungsreaktion von Insulin an seinen Rezeptor erfolgt an der Zelloberfläche (Plasmamembran) und ist bei physiologischen Temperaturen keine einfache bimolekulare Reaktion. Ein Mechanismus, der zur Komplizierung der Wechselwirkungen zwischen Insulin und Rezeptor beiträgt, ist die Internalisierung des gebundenen Hormons, d.h. seine Translokation ins Zellinnere. Erste Hinweise auf diesen Ablauf ergaben sich aus Befunden von Terris und Steiner (310), daß die Insulinbindung an Hepatocyten als Voraussetzung für den Insulinabbau anzusehen ist, der Abbau aber erst nach einer Verzögerung einsetzt und unterhalb von 20°C trotz Insulinbindung vernachlässigbar ist. Daraus ließ sich schließen, daß Insulin intrazellulär abgebaut werden muß. Die Beobachtung, daß die Dissoziierbarkeit von zellgebundenem Insulin bei 37°C zeitabhängig abnimmt, wurde ebenfalls als Indiz für Internalisierung gewertet (166). Auch für EGF (epidermal growth factor), ein anderes Polypeptidhormon, konnte die Internalisierung wahrscheinlich gemacht werden (35).

Durch die Einführung der quantitativen elektronenmikroskopischen Autoradiographie konnte die Translokation von zellgebundenem ^{125}J-Insulin ins Zellinnere dann direkt nachgewiesen werden (36, 37, 115, 116, 120). Weitere Nachweise der Internalisierung von ^{125}J-Insulin (20, 39, 71, 152, 289, 305) und anderen Liganden (13, 121, 129, 227, 289) konnten in der Folge mit unterschiedlichen Methoden und in verschiedenen Geweben vorgelegt werden.

Makromoleküle können nur durch einen endocytotischen Mechanismus ins Innere einer Zelle gelangen. Für den Fall, daß Liganden zuerst an Rezeptoren binden und nach diesem selektiven Konzentrierungsschritt internalisiert werden, spricht man von rezeptorvermittelter Endocytose oder adsorptiver Pinocytose (231, 300). Dieser für Polypeptidhormone allgemein angenommene Internalisierungsmechanismus hat zur Folge,

daß der Ligand-Rezeptor-Komplex ins Zellinnere aufgenommen wird (106, 122, 123, 183, 248, 249, 269).

Für den Ablauf der Internalisierung gibt es bislang folgendes Bild. Die in der Plasmamembran frei beweglichen Rezeptoren sammeln sich (Rezeptorclustering) nach Besetzung durch Insulin (12, 153, 155, 227, 289) oder auch durch Rezeptorantikörper (42) in sog. "coated pits", die dann durch Einstülpung "coated vesicles" bilden (87, 119, 122, 123, 253, 259). Diese Vesikel übernehmen den intrazellulären Transport des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Das internalisierte Insulin wird lysosomal (38, 40, 77, 78, 133, 214, 311, 323) und/oder nichtlysosomal (77, 78, 323) abgebaut, während das Schicksal des Rezeptors umstritten ist (s.u. und 5.4.).

Über den Internalisierungsmechanismus ist noch wenig bekannt. Eine Beteiligung von Transglutaminasen wird angenommen, da mit einigen Transglutaminaseinhibitoren eine Inhibition des Rezeptorclustering und der Internalisierung verschiedener Liganden beobachtet wurde (8, 63, 130, 209, 228). Allerdings wurden auch gegenteilige Ergebnisse erhalten (2, 131, 182, 291).

Ein interessanter Vorschlag wurde in neuerer Zeit gemacht, nach dem das Rezeptorclustering durch Wechselwirkungen zwischen gebundenen Insulinmolekülen im Sinne von Insulindimerisierung erreicht wird (162). Voraussetzung für dieses Modell ist, daß der Insulinrezeptor mindestens bivalent ist.

Bei der Bildung der endocytotischen Vesikel scheint Clathrin, das Hauptprotein der coated pits und coated vesicles (250, 251), eine Rolle zu spielen. Die Clathrinhülle (coat) ist zu einem ebenen Netzwerk aus Sechsecken angeordnet. Durch zunehmenden Einbau von Fünfecken soll dieses in eine dreidimensionale Form übergehen, sodaß eine Einstülpung zum Vesikel erreicht wird (143, 252, 253, 314). Obwohl angenommen wird, daß es für verschiedene Liganden einen gemeinsamen Internalisierungsweg gibt (227), wurden auch Vesikel ohne

Clathrinhülle ("uncoated vesicles" oder "Rezeptosomen") als intrazelluläre Transportorganelle charakterisiert (328, 330, 334, 335). Es bleibt ungeklärt, ob zwei verschiedene Mechanismen des intrazellulären Transports vorliegen.

Eine Beteiligung der Mikrotubuli an der Internalisierung wurde ebenfalls diskutiert. Dies wurde vermutet, weil Colchicin den rezeptorvermittelten Insulinabbau inhibiert (310).

Auch auf die Frage nach dem Zweck der Internalisierung des Insulinrezeptors gibt es bislang kaum eine befriedigende Antwort. Sie dient wohl der Termination des Insulinsignals durch intrazellulären Abbau des Hormons (38, 145, 207, 310, 322). Für eine Funktion von Insulinabbauprodukten bei der Signalvermittlung, wie von Steiner (303) vorgeschlagen, gibt es keine Hinweise. Dagegen könnte das intakte Insulinmolekül in der Zelle verschiedene Insulineffekte auslösen (114, 322), da in verschiedenen Zellkompartimenten wie endoplasmatischem Retikulum (148, 165, 325), Golgiapparat (18, 267, 268, 287), Lysosomen (38-40, 181) und Kernmembran (65, 111, 113, 118, 148, 149) Insulinrezeptoren nachgewiesen wurden.

Für den internalisierten Rezeptor ist ebenfalls eine Aufgabe bei der Signalvermittlung denkbar. So konnte gezeigt werden, daß Rezeptorantikörper, die biologische Wirkungen von Insulin auslösen können (7, 93, 156, 317), nach Bindung an den Insulinrezeptor dieselbe Ereigniskette wie Insulin durchlaufen (42). Dies spricht dafür, daß der Rezeptor und nicht der Ligand für die biologischen Wirkungen verantwortlich ist (vgl. dazu auch 174, 212, 319, 344). Ein Anhaltspunkt, ob die Internalisierung für die Auslösung biologischer Effekte nötig ist, ergibt sich aus diesem Befund jedoch nicht.

Durch die Internalisierung des Rezeptors steht der Zelle ein Mechanismus zur Verfügung, die Rezeptorkonzentration auf

der Zelloberfläche zu verändern und so möglicherweise die Insulinsensitivität zu regulieren. Von Gavin et al. (105) wurde zuerst gezeigt, daß chronische Exposition mit Insulin zu einer Verminderung der Insulinrezeptorzahl auf der Zelloberfläche von Lymphocyten führt. Dieses von vielen Autoren beobachtete Phänomen der "Down Regulation" von Rezeptoren (23, 33, 198, 216, 236) wird als ein solcher Regulationsmechanismus angesehen. Es erschien einfach, die Down Regulation als Folge der Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes zu erklären (198, 217, 236). Wie von Terris (312) diskutiert wurde, ist diese Erklärung jedoch nicht ausreichend, da die Internalisierung ein akutes Ereignis ist, welches im Zeitraum von Minuten nach der Insulinbindung zu beobachten ist (41, 115, 122), während es für die Down Regulation, wie oben erwähnt, chronischer Exposition mit Insulin über Stunden bedarf (105, 196, 198). Es ist nicht auszuschließen, daß die Down Regulation in vivo nur bei bestimmten Hyperinsulinämien eine Rolle spielt (10, 168, 242, 243), während sie in vitro möglicherweise nur als Folge unphysiologischer Inkubationsbedingungen auftritt (218, 279).

Während Insulin nach der Internalisierung abgebaut wird (s.o.), scheint der Insulinrezeptor in Hepatocyten nicht abgebaut zu werden. Wie die Überlegungen von Terris (312) zum Insulin- und damit Rezeptorturnover in Hepatocyten zeigen, ist die Stabilität der beobachteten Steady-State-Bindung von ^{125}J-Insulin nur mit einem ständigen Recycling der internalisierten Rezeptoren zur Plasmamembran zu erklären. Ersatz durch de novo Synthese scheidet aus, da auch in Gegenwart von Cycloheximid stabile Insulinbindung gemessen werden konnte (312). Recycling als Mechanismus zur Rezeptorregulation wurde auch durch andere experimentelle Befunde wahrscheinlich gemacht (91, 199, 219).

Das Schicksal des Rezeptors unterliegt möglicherweise gewebespezifischen Unterschieden. In Fettzellen, IM-9 Lymphocyten und 3T3 Mäusefibroblasten wurde im Unterschied zu Hepatocyten mit verschiedenen Methoden eine insulininduzierte

Erhöhung der Rezeptorabbauraten nachgewiesen (127, 188, 196, 282, 318). In welchem Ausmaß Endocytose-, Recycling-, Abbau- und Syntheseraten die Rezeptorregulation im einzelnen kontrollieren, bleibt noch zu klären.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellte sich zu diesem Themenkomplex zuerst die Frage, wie die Internalisierung von Insulin verhindert werden kann, um mit der Methode der Photoaffinitätsmarkierung ausschließlich Rezeptoren der Plasmamembran von Hepatocyten markieren zu können. Die Wirksamkeit potentieller Inhibitoren sollte weitere Hinweise auf den Mechanismus der Internalisierung geben. Ferner sollte das Schicksal des durch Photoaffinitätsmarkierung hergestellten kovalenten Insulin-Rezeptor-Komplexes in Hepatocyten direkt verfolgt werden. Die Verteilung von Rezeptoren auf Plasmamembran und Zellinneres sollte bestimmt werden, um den Effekt von Insulin und evtl. von Agenzien, die Einfluß auf die Internalisierung nehmen, auf die zelluläre Rezeptorverteilung bestimmen zu können. Durch Bestimmung des Rezeptorgehalts der Hepatocyten sollten auch Hinweise auf insulininduzierten Rezeptorabbau gewonnen werden. Mit den gesammelten Daten sollen einige Kriterien für den Rezeptorturnover in Hepatocyten aufgestellt werden.

Eine weitere Frage, der bei der Interpretation von Dissoziationsversuchen Bedeutung zukommt, ist die, ob bei Inkubation von ^{125}J-Insulin mit Hepatocyten ein kovalenter Ligand-Rezeptor-Komplex entsteht. Dies wurde vereinzelt in einigen Geweben für Insulin (45, 285) und andere Liganden (6, 210) gefunden.

1.3. Frisch isolierte Hepatocyten als experimentelles System

Für die Untersuchung des Insulinrezeptors sind eine Reihe frisch isolierter oder kultivierter Zellsysteme eingeführt worden (9, 23, 51, 98, 104, 145, 177, 241, 255, 276, 310), wobei Fett- und Leberzellen als wichtigen Insulinzielzellen eine besondere Bedeutung zukommt. Frisch isolierte Hepatocyten wurden von vielen Autoren als Zellsystem für Untersuchungen im Zeitbereich von wenigen Stunden eingesetzt (38, 74, 103, 241, 310), Dieses in-vitro-System bereitet einige experimentelle Probleme, auf deren wichtigste hier kurz eingegangen werden soll.

Ein Hauptproblem bei Bindungsstudien ist der bei Inkubation mit ^{125}J-Insulin zu beobachtende, insbesondere bei Temperaturen oberhalb etwa 20°C massive Insulinabbau (103, 207, 241, 310). Dabei ist zu unterscheiden zwischen rezeptorvermitteltem, d.h. intrazellulärem Abbau (78, 103, 310) und durch Ausbluten proteolytischer Enzyme aus den Zellen im Medium lokalisiertem Abbau (5, 38, 77, 78, 103, 247). Während ersterer vermutlich dem physiologischen Schicksal des gebundenen Hormons entspricht (vgl. 1.2.), ist letzterer als Folge der mechanischen und enzymatischen Einflüsse während der Isolierung der Zellen zu werten und wird von vielen Autoren beschrieben. Demgegenüber finden Terris und Steiner (310) über 98 % rezeptorvermittelten Insulinabbau. Mit kultivierten Hepatocyten wurde ebenfalls nur zellulärer Insulinabbau gefunden (32, 82, 261), vermutlich weil die Zellen nach ihrer Isolierung bessere Möglichkeiten der Regeneration haben.

Bei der Untersuchung des Bindungsverhaltens von Insulin an den Rezeptor stört bei physiologischen Temperaturen auch die Internalisierung des Hormons (vgl. 1.2.). Bei Temperaturen unterhalb von 20°C gewonnene Daten können nicht ohne weiteres auf die Eigenschaften der Insulin-Rezeptor-Wechselwirkungen bei 37°C übertragen werden (9, 68, 103, 145, 289).

Als weiterer Störfaktor ist möglicherweise die negative Proteinbilanz frisch isolierter Hepatocyten anzusehen (297). Es ist denkbar, daß der Rezeptorgehalt der Zellen sich dadurch während der Inkubation ändert.

Zu diesen drei Punkten, die bei höheren Temperaturen ein Bindungsgleichgewicht von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten nicht zulassen, kommen die verschiedenen Modifikationen bei der Gewinnung von Hepatocyten, die vermutlich für die unterschiedlichen Charakteristika der Insulinbindung aus verschiedenen Arbeitsgruppen mitverantwortlich sind (32, 72, 74, 88, 103, 175, 177, 241, 310). Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, Bindungs- und Abbauverhalten der in dieser Arbeit isolierten Hepatocyten zu untersuchen. Gleichzeitig sollte versucht werden, für die einzelnen Fragestellungen jeweils optimale Inkubationsbedingungen zu finden.

2. ABKÜRZUNGEN UND SCHREIBWEISEN

Alb	Rinderserumalbumin
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
CON A	Concanavalin A
cpm	Impulse pro Minute
DABI	$N^{\alpha A1}$,$N^{\varepsilon B29}$-Di(4-azidobenzoyl)insulin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
GB	Gesamtbindung
GRP	Gesamtrezeptorpool
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IM	Isolationsmedium
IRP	intrazellulärer Rezeptorpool
K_D	Dissoziationskonstante
KNaPP	Kalium-Natrium-Phosphatpuffer, wenn nicht anders angegeben 0,1 M und pH 7,4
MABI	$N^{\varepsilon B29}$-Mono(4-azidobenzoyl)insulin
MeMan	α-Methyl-D-Mannosid
MG	Molekulargewicht
NEM	N-Ethylmaleimid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PM	Perfusionsmedium
PPM	Präperfusionsmedium
rpm	Umdrehungen pro Minute
SB	spezifische Bindung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tri, Triton	Triton-X-100
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
USB	unspzeifische Bindung
WGA	Weizenkeimagglutinin

Alle Prozentangaben in dieser Arbeit sind als %(w/v) zu verstehen.

Zur Schreibweise von Puffern sei ein Beispiel gegeben:

IM/0,5 % Alb/0,1 % Bacitracin

Der Puffer (Isolationsmedium) enthält 0,5 % Albumin und 0,1 % Bacitracin.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Chemikalien, Biochemikalien

Acrylamid (speziell gereinigt für die Elektrophorese)	BDH, Poole (England)
Aldolase aus Kaninchenmuskel	Boehringer, Mannheim
Bacitracin (min. 50.000 Units/g)	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Colchicin	Sigma, München
Collagenase Typ I	Sigma, München
CON A	Serva, Heidelberg
Coomassie Brillant Blue	Sigma, München
Cytochalasin B	Sigma, München
Dansylcadaverin	Sigma, München
DTE	Serva, Heidelberg
β-Galactosidase aus E. coli	Sigma, München
γ-Globulin aus Rinderserum (etwa 98 %)	Serva, Heidelberg
Glycin p.A.	Serva, Heidelberg
HEPES	Sigma, München
Katalase aus Rinderleber	Boehringer, Mannheim
N,N'-Methylenbisacrylamid (speziell gereinigt für die Elektrophorese, vor Gebrauch einmal aus Aceton umkristallisiert)	BDH, Poole (England)
α-Methyl-D-Mannosid (Grade III, 99 %)	Sigma, München
Myosin aus Kaninchenmuskel	Sigma, München
$Na^{125}J$	Amersham-Buchler, Braunschweig
NEM	Serva, Heidelberg
Ovalbumin	Sigma, München
PEG Typ 6000	Serva, Heidelberg
Phenylglyoxal	EGA,Chemie, Steinheim/ Albuch

Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel	Sigma, München
Rinderserumalbumin Fraktion V, 96-99 %, A8022	Sigma, München
Rinderserumalbumin Fraktion V, RIA-grade (speziell gereinigt für Insulin-RIA) A7888	Sigma, München
Röntgenentwickler und -fixiersalz	Adefo, Nürnberg
RNA-Polymerase aus E. coli	Boehringer, Mannheim
SDS	Serva, Heidelberg
Sephadex G50 fine, Sepharose CL 4B Sepharose CL 6B SP-Sephadex C25	Pharmacia Fine Chemicals Uppsala(Schweden)
TEMED	Serva, Heidelberg
Tris (TRIZMA Base)	Sigma, München
Tris/HCl (TRIZMA preset pH 8,7)	Sigma, München
Triton-X-100 p.A.	Serva, Heidelberg
Trypanblau (0,5 %ige Lösung in physiol. NaCl)	Serva, Heidelberg
Trypsin aus Rinderpankreas Typ III	Sigma, München
Trypsininhibitor aus Sojabohnen Typ II-S	Sigma, München

Rinderinsulin war ein Geschenk der Fa. Hoechst, Frankfurt, und wurde entzinkt nach Koch (189) und anschließend direkt über Sephadex G50 fine (Säule 4 x 100 cm) gereinigt und lyophilisiert.

Octylglucose wurde freundlicherweise von Herrn Eberhard Trummer, Spectrin von Herrn Sørge Kelm, präpariert nach (178), zur Verfügung gestellt.

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

3.2. Verbrauchsmaterial

Braunülen (1 mm)	Braun, Melsungen
Chromatographiepapier 3 mm	Whatman, Maidstone (England)
Polyamidgaze (Maschenweite 150 und 200 µm)	Eckert, Waldkirch
Polystyrolreagenzgläser 11 x 70 mm, 12 x 75 mm, 16 x 100 mm	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilm Kodak X-O-MAT AR (XAR-5), 20 x 25 cm	Eastman Kodak Comp., Rochester, N.Y. (USA)

3.3. Versuchstiere

Zur Gewinnung von Hepatocyten wurden männliche Ratten (Sprague-Dawley) mit einem Körpergewicht von 240-310 g verwendet. Sie wurden von der Süddeutschen Versuchstierfarm Tuttlingen bezogen oder entstammten der hauseigenen Weiterzucht.

3.4. Geräte

Zentrifugen:	
Labofuge I mit Gehängearbeitskopf 2106	Heraeus-Christ, Osterode
Minifuge II mit Tragringrotor 3350	Heraeus-Christ, Osterode
Servall "Automatic Superspeed" mit Rotor SS 34	Hormuth-Vetter, Heidelberg-Wiesloch
Beckman L5-65 mit Rotor 75 Ti	Beckman, München
Gammacounter:	
Kontron MR 480 TP	Kontron, München
Auto Gamma Scintillation Spectrometer 5230	Packard, Frankfurt

Fraktionssammler:	
Ultrorac LKB 7000	LKB, Bromma (Schweden)
Multirca LKB 2111	LKB, Bromma (Schweden)
Elektrophoresegeräte:	
Stromversorgung Vokam 2541 und Vokam SAE 2761	Shandon, London (England)
Power Supply LKB 2197	LKB, Bromma (Schweden)
Elektrophoresekammer "Protean Dual Vertical Slab" (32 cm)	Biorad, München
Elektrophoresekammer Eigenbau	Institutswerkstatt
Aldo-Xer Geltrockner	Schütt, Göttingen
Geltrockner LKB 2003	LKB, Bromma (Schweden)
Thermostate:	
Braun Thermomix 1441	Braun, Melsungen
Multitemp LKB 2209	LKB, Bromma (Schweden)
Gefrierschrank VF 85-300 S (-80°C)	Colora, Lorch
Photometer M4 Q II mit PM Q II	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop "BiS 5"	Beck, Kassel
Braun Minishaker	Braun, Melsungen
Schlauchpumpe Ismatec MP 4	Ismatec, Zürich (Schweiz)
Digital pH-Meter	Bachofer, Reutlingen
Homogenisator Potter S mit Teflonkolben	Braun, Melsungen
UV-Lampe Philips HPK 125 W	Philips, Hamburg
Röntgenverstärkerfolien:	
Chronex Hi-Plus und Par Speed	Du Pont de Nemours, Frankfurt
Titan 2 U	Siemens, Erlangen

3.5. Präparation von MABI und DABI

Die Präparation von 4-Azidobenzoylinsulin erfolgte im wesentlichen nach der Vorschrift in (186), modifiziert nach (339). Die Reaktionsprodukte wurden anschließend nach (340) getrennt.

Während der Präparation wurden alle Reaktionsgefäße mit Aluminiumfolie abgedunkelt und direktes Tageslicht abgeschirmt, um Photolyse des Arylazids zu vermeiden.

40 mg Insulin wurden in 3,2 ml DMF und 15 µl Triäthylamin gelöst. Dazu wurden 0,5 ml aus einer frisch hergestellten Lösung vom N-Hydroxysuccinimidester der 4-Azidobenzoesäure (100, 186) in DMF (9,5 mg/ml) gegeben. Nach fünf Stunden Reaktion bei Raumtemperatur wurden 6 ml 1 N Essigsäure (eiskalt) zugegeben und mit 1 N NH_3 auf etwa pH 5,4 eingestellt. Die dabei ausgefallenen Reaktionsprodukte wurden ein bis zwei Stunden stehengelassen und bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 3,5 ml 1,5 M Essigsäure/6 M Harnstoff/0,02 M NaCl gelöst und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte Säule (2 x 40 cm) mit SP-Sephadex C25 aufgetragen. Die verschiedenen Insulinderivate wurden durch Elution in einem linearen Salzgradienten aus 400 ml 0,02 M und 0,4 M NaCl, jeweils in 1,5 M Essigsäure/6 M Harnstoff, voneinander getrennt. Das Elutionsprofil in Abb. 1 zeigt, daß hauptsächlich zwei Produkte (MABI und DABI, vgl. 4.4.1.) erhalten wurden. Die Fraktionen des MABI- und des DABI-Peaks wurden jeweils vereinigt und bei 4°C über Nacht gegen je 1,5 l 0,02 M Ammonium-Acetat-Puffer pH 8 dialysiert, wobei die Insulinderivate ausfielen. Nach weiterer Dialyse gegen H_2O dest. wurde lyophilisiert. Die Azidobenzoylinsuline wurden über Sephadex G50 fine (Säule 1,1 x 50 cm) weiter gereinigt. Das MABI wurde mit 2 ml 1 N Essigsäure versetzt, durch Zugabe von einigen Tropfen 2 N HCl vollständig in Lösung gebracht und auf die Säule aufgetragen. Nach Elution in 1 N Essigsäure wurden die MABI-Fraktionen vereinigt und lyophilisiert. Das DABI wurde in 2 ml 0,1 M Ammonium-Acetat-Puffer

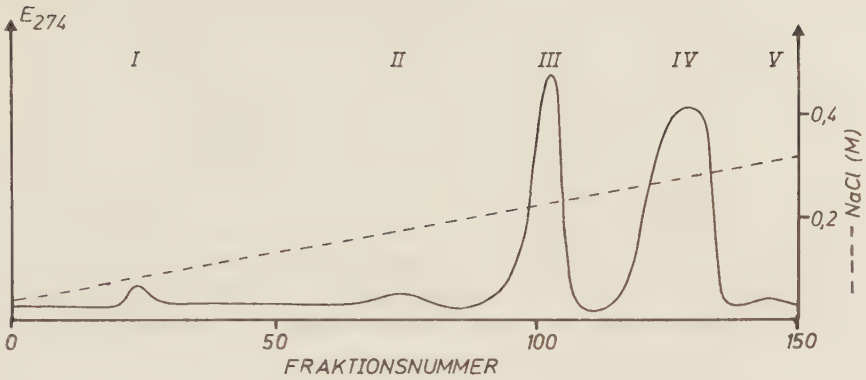


Abb. 1: Trennung verschiedener Azidobenzoylinsuline über Sephadex C25. Hauptprodukte sind MABI (IV) und DABI (III). Weitere Erläuterungen im Text.

pH 7,8 aufgenommen und durch Zugabe von einigen Tropfen 1 N NH_3 gelöst. Nach Auftragen auf die Säule wurde in dem Ammonium-Acetat-Puffer eluiert, die DABI-Fraktionen vereinigt und lyophilisiert. Die Ausbeuten betrugen etwa 7-12 mg für MABI und 2-3 mg für DABI.

Die Endgruppenbestimmung mit Fluoridinitrobenzol zur Strukturaufklärung der Derivate wurde nach Africa und Carpenter (1) durchgeführt.

3.6. Jodierung von Insulin und MABI mit ^{125}J

Zur Jodierung von Insulin und MABI wurde die Methode von Hunter und Greenwood (150, Durchführung nach 189) gewählt. Bei der Jodierung von MABI wurden alle Reaktionsgefäße mit Alufolie abgedunkelt und direktes Tageslicht abgeschirmt.

Bei Raumtemperatur wurden nacheinander in ein Reagenzglas pipettiert:

10 µl $Na^{125}J$ (37 MBq ≙ 1 mCi, etwa 0,5 nMol)
100 µl KNaPP
10 µl Insulin oder MABI in KNaPP (0,4 mg/ml, 0,7 nMol)

Start der Reaktion:
20 µl Chloramin T in H_2O (1 mg/ml, 7×10^{-8} Mol)
Während der Reaktion wurde kräftig gemischt.

Nach 40 sec. wurde die Reaktion gestoppt:
20 µl $Na_2S_2O_5$ in H_2O (3 mg/ml, 3×10^{-7} Mol)

Nach erneutem Mischen wurde zugegeben:
10 µl KNaPP/0,5 % Tri/2 % Alb

Zur Reinigung des ^{125}J-Insulins bzw. ^{125}J-MABIs wurde das Reaktionsgemisch auf eine Säule (Sephadex G50 fine, 1,3 x 50 cm) aufgetragen und bei 4°C in KNaPP/0,1 % Tri eluiert. Das Elutionsdiagramm wurde durch Auszählen von 5 µl-Aliquots aus jeder Fraktion (1 ml) am Gammacounter erhalten. Die Fraktionen des ^{125}J-Insulin-(MABI-)Peaks wurden mit je 50 µl KNaPP/0,1 % Tri/2 % Alb versetzt (Radiolyseschutz) und eingefroren. Das so hergestellte Tracerinsulin (-MABI) hatte eine spezifische Aktivität von 200-250 µCi/µg.

3.7. Präparation von Membranen, Membranenextrakten und CON A-Eluaten aus Rattenleber

3.7.1. Lebermembranen und Tritonextrakt

Mikrosomale Lebermembranen wurden aus Leberhomogenaten durch Zellfraktionierung hergestellt. Die Insulinrezeptoren wurden mit Triton aus den Membranen extrahiert. Die Präparation von Membranen und Extrakt wurden nach den Vorschriften von Koch (191), modifiziert nach (52, 53), ausgeführt.

3.7.2. CON A-Eluat

Nach 3.7.1. gewonnene Tritonextrakte zeigen Insulinabbauaktivität (191, 197, 237). Für manche Versuche wurden deshalb CON A-Eluate hergestellt. Mit dieser von Koch und Weber (190) beschriebenen Methode kann der Insulinrezeptor von insulinabbauenden Enzymen abgetrennt werden. Aus Tritonextrakt fällt der Insulinrezeptor im Gegensatz zur gesamten Insulinabbauaktivität durch Zugabe von CON A (1 mg/ml) aus und kann nach Zentrifugation aus dem Pellet mit 0,3 M MeMan in KNaPP/ 0,1 % Tri wieder in Lösung gebracht werden (Durchführung s. 190, 191, vgl. auch 3.10.2.).

3.8. Isolierung von Rattenhepatocyten

Die Isolierung von Hepatocyten wurde in einem zweistufigen Verfahren in Anlehnung an die von Seglen (292-294) beschriebene Methode durchgeführt (vgl. auch 22, 151, 273, 288, allgemeine Übersicht s. 232, 296). Die Durchführung der Isolierung wurde bereits in (186) dargestellt, daher soll hier nur ein Überblick über die Methode gegeben werden. Lediglich

die eingeführten Veränderungen, insbesondere beim Waschen der Zellen, werden genauer beschrieben.

In der ersten Stufe der Präparation (wie die gesamte Isolierung bei 37°C) wurde die Leber mit einem Ca^{2+}-freien Medium (PPM, Zusammensetzung der Medien s. Tabelle 1) mit einem Druck von 70 cm Wassersäule durchspült. Während dieser offenen Perfusion mit 600-800 ml PPM wurde die Leber aus dem Bauchraum herauspräpariert. Die Perfusion der isolierten Leber wurde dann auf PM (Druck 45 cm Wassersäule) umgestellt (zweite Präparationsstufe). Sobald die Leber in die Perfusionsapparatur überführt worden war, wurde Collagenase und Ca^{2+} zugegeben und mit insgesamt 85 ml rezirkulierend perfundiert. Nach 15-20 Minuten wurde die brüchig gewordene Leber in ein Becherglas mit etwa 60 ml IM überführt und von evtl. vorhandenen Zwerchfellresten befreit. Die Leber wurde dann mit einer Pinzette solange geschüttelt, bis sie weitgehend in ihre Zellen zerfallen war. Gelegentlich war es für eine optimale Zellausbeute nötig, die Organkapsel mit einer Schere an verschiedenen Stellen aufzuschneiden. Die Zellsuspension wurde durch Polyamidgaze (zuerst 200, dann 150 µm) filtriert, zentrifugiert (6 Minuten bei 280 rpm, Labofuge I) und das Zellpellet in 80 ml IM suspendiert. Die Zellen wurden nun sooft zentrifugiert und wieder aufgenommen (gewöhnlich zwei bis drei mal), bis der Überstand nach der Zentrifugation nahezu klar war. Beim letzten Waschschritt wurde 7 Minuten bei 240 rpm zentrifugiert. Beim Abdekantieren der Überstände wurde darauf geachtet, daß die oben auf dem Zellpellet liegende Schicht von größeren Zelltrümmern weitgehend mit abgetrennt wurde. Durch diese Waschprozedur wurden nichtparenchymale Zellen und ein Großteil an zerstörten Zellen abgetrennt.

Die Vitalität der Hepatocyten wurde mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau bestimmt und war in allen Versuchen 92-96 %, die Ausbeute betrug $3 - 7{,}5 \times 10^8$ Zellen.

PPM

		g/l	mM
Salze	NaCl	7,1	121
	KCl	0,4	5,36
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,19	0,77
	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,19	0,93
	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	0,12	0,34
	KH_2PO_4	0,06	0,44
	$NaHCO_3$	1,875	22
	Glucose	1,0	5,6

Das PPM wird vor Verwendung eine Stunde lang mit Carbogen (95 % O_2, 5 % CO_2) begast und auf 37°C erwärmt.

IM

	g/l	mM
NaCl	8,0	137
KCl	0,4	5,36
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,29	1,17
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	0,282	0,79
KH_2PO_4	0,02	0,15
HEPES	2,38	10
Glucose	1,0	5,6

Das IM wird eine Stunde lang bei 37°C mit O_2 begast und anschließend mit 2 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

PM

	g/l	
Salze wie beim PPM		
$NaHCO_3$	1,875	
Glucose	2,0	0,2 %
Albumin	20	2,0 %
Collagenase		35 - 50 mg
$CaCl_2$		2 mM
Gesamtvolumen 85 ml		

$NaHCO_3$ (Stammlösung 7,5 %) wird zu Beginn der Begasung mit Carbogen (wie PPM) in der Perfusionsapparatur (37°C) zugegeben.
Collagenase (Menge je nach Aktivität) wird in etwa 10 ml Salzlösung und erst bei Beginn der rezirkulierenden Perfusion zugegeben.
$CaCl_2$ (Stammlösung 0,2 M) wird nach der Collagenase zugegeben.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Medien für die Isolierung und Inkubation der Hepatocyten

3.9. Präparation von Membranen und Membranextrakt aus isolierten Hepatocyten

Die Isolierung von Lebermembranen mit anschließender Tritonextraktion nach Koch (191, vgl. 3.7.) wurde mit einigen Änderungen auf eine Präparation aus isolierten Hepatocyten übertragen. Die Änderungen waren einerseits bei der Herstellung des Homogenats notwendig, da sich eine Zellsuspension nicht so gut homogenisieren läßt wie ein zerkleinertes Organ, andererseits mußte der Maßstab der Präparation verändert werden, da, verlichen mit 3.7., nur ein Zwanzigstel des Lebermaterials aufgearbeitet wurde.

120 ml einer Suspension mit 1,2 - 1,4 x 10^6 Zellen/ml wurden 10 Minuten bei 450 rpm (Minifuge II) sedimentiert, das Zellpellet in 4 ml 0,01 M KNaPP/0,25 M Sucrose/1,2 mM NEM[1)] aufgenommen und in einem 5 ml Potter S mit Teflonkolben bei 4°C (wie auch alle weiteren Schritte) homogenisiert (250 rpm, 50 mal auf und ab). Das Homogenat wurde 10 Minuten bei 1000 g (Minifuge II, 3300 rpm) zentrifugiert, der erhaltene Überstand (Ü 1) wurde bei 20.000 g (30 Minuten bei 13.000 rpm im SS 34) erneut zentrifugiert. Aus diesem 20.000 g-Überstand (Ü 2) wurden bei 100.000 g (35 Minuten bei 40.000 rpm im 75 Ti) mikrosomale Lebermembranen sedimentiert. Diese wurden in 0,01 M KNaPP soweit als möglich suspendiert und wieder abzentrifugiert (45 Minuten bei 50.000 g, 75 Ti bei 28.000 rpm). Dieser Waschschritt wurde wiederholt.

Die Pellets aus der 1000 g und der 20.000 g-Zentrifugation (P 1 und P 2) wurden mit jeweils 2 ml 0,01 M KNaPP/1 % Tri extrahiert (eine Stunde bei Raumtemperatur), anschließend

---

[1)] Die hier beschriebene Zellfraktionierung wurde mit Zellen nach Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors durchgeführt (s. 3.13.). Um evtl. auftretenden Abbau des kovalent gebundenen ^{125}J-MABIs und damit Verlust der radioaktiven Markierung des Rezeptors zu verhindern, wurde NEM als Abbauinhibitor eingesetzt (237).

mit 0,01 M KNaPP 1:3 verdünnt. Die ungelösten Rückstände wurden abzentrifugiert (30 Minuten bei 5500 rpm in der Minifuge II), die Extrakte eingefroren.

Die Lebermembranen wurden mit 0,5 ml 0,01 M KNaPP/1 % Tri ebenso extrahiert, nach Verdünnen mit 2 ml 0,01 M KNaPP jedoch 40 Minuten bei 100.000 g zentrifugiert (75 Ti) und der Extrakt eingefroren.

3.10. Rezeptorextrakte und CON A-Eluat aus isolierten Hepatocyten

3.10.1. Tritonextrakt

Für verschiedene Fragestellungen wurden die Insulinrezeptoren mit Triton direkt aus den Zellen extrahiert. Der jeweilige Inkubationsansatz (12 ml, etwa 15 x 10^6 Zellen) wurde bei 450-800 rpm in der Minifuge II abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml 0,01 M KNaPP/1,5 % Tri/0,08 % Bacitracin versetzt. Nach Photoaffinitätsmarkierung der Zellen wurde gelegentlich ohne Bacitracin oder mit 1,2 mM NEM im Extraktionspuffer extrahiert. Durch mehrfaches Aufziehen durch eine Pipettenspitze wurde das Zellpellet homogenisiert. Nach einstündigem Rühren der Suspension bei Raumtemperatur wurde mit 2,6 ml 0,1 M KNaPP (bei Elektrophoreseproben mit 0,01 M KNaPP, vgl. 3.16., für Gelchromatographie an Sepharose CL 6B mit 2 ml 0,05 M KNaPP/0,1 M NaCl/0,1 % Tri/ 0,02 % NaN_3, vgl. 3.14.) verdünnt und bei 100.000 g (75 Ti, 40.000 rpm) zentrifugiert. Der klare Tritonextrakt zwischen Pellet und Lipidphase wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt, der lipidhaltige Teil wurde verworfen. Der Extrakt wurde eingefroren oder zur CON A-Fällung verwendet. Der Proteingehalt der Extrakte lag üblicherweise bei etwa 5 mg/ml.

3.10.2. CON A-Eluat

Da der oben gewonnene Tritonextrakt starke Insulinabbauaktivität zeigte, wurde der Insulinrezeptor durch CON A-Fällung (geringfügig verändert nach (190), vgl. 3.7.2.) von der Abbauaktivität befreit. Dazu wurden 2 ml Tritonextrakt (Tritongehalt etwa 0,4 %) mit 0,2 ml CON A (11,5 mg/ml KNaPP) und 20 µl $CaCl_2$ + $MnCl_2$ (je 30 mM in H_2O) versetzt und 12-15 Stunden bei 4°C gerührt. Der entstandene Niederschlag wurde 30 Minuten bei 12.000 rpm (SS 34) abzentrifugiert, der Überstand verworfen. Zum Pellet wurden 2 ml 0,1 M KNaPP/0,1 % Tri/0,3 M MeMan pipettiert, durch einstündiges Rühren bei Raumtemperatur wurde es in Lösung gebracht. Dieses CON A-Eluat wurde 15 Minuten zentrifugiert (12.000 rpm, SS 34), wenn es durch ausgefallene Salze trüb war.

3.10.3. Octylglucoseextrakt

Zum Vergleich mit der Tritonextraktion wurde der photoaffinitätsmarkierte Insulinrezeptor auch mit Octylglucose aus Hepatocyten extrahiert (125). Es wurde genau gleich verfahren, wie in 3.10.1. beschrieben, als Extraktionspuffer wurde 0,01 M KNaPP/1 % Octylglucose/± 1,2 mM NEM verwendet. Nach Verdünnen (1:3) mit 0,05 M KNaPP/0,1 M NaCl/0,1 % Octylglucose/0,02 % NaN_3 wurde zentrifugiert, der Extrakt sofort zur Gelfiltration (Sepharose CL 6B) verwendet oder eingefroren (vgl. 4.5.1.).

3.11. Bindungsstudien

3.11.1. Inkubation von Tritonextrakten bzw. CON A-Eluaten mit ^{125}J-Insulin

Alle Bindungstests von ^{125}J-Insulin mit Tritonextrakt oder CON A-Eluat wurden 20-30 Stunden bei 4°C inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden 30 µg natives Insulin pro ml zur Inkubation eingesetzt. Für Verdrängungskurven bzw. Scatcharddiagramme (286) wurden steigende Insulinkonzentrationen von 0-30 µg/ml verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden von allen Meßwerten Dreifachbestimmungen angesetzt. Folgende Ansätze wurden pipettiert:

100 µl ^{125}J-Insulin in KNaPP/0,1 % Alb/0,03 % Tri (etwa 80.000 cpm)

100 µl KNaPP/0,1 % Alb/0,03 % Tri mit Insulin (0-90 µg/ml)

100 µl Tritonextrakt oder CON A-Eluat (KNaPP/0,1 % Tri)

Somit enthielten alle Inkubationen 0,066 % Albumin und 0,053 % Triton. Die Konzentration an ^{125}J-Insulin betrug etwa 0,1 nM. Nach Inkubationsende wurde gebundenes von freiem ^{125}J-Insulin durch PEG-Fällung getrennt. Der Insulin-Rezeptor-Komplex wurde durch Zugabe von 200 µl 0,3 %igem γ-Globulin in KNaPP und 500 µl 20 %igem PEG in H_2O ausgefällt (kräftig mischen) und nach 15 Minuten stehen lassen abzentrifugiert (Minifuge II, 15 Minuten bei 5500 rpm). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet zweimal mit einer Röhrchenfüllung Leitungswasser gewaschen (alles bei 4°C). Durch Auszählen im Gammacounter bestimmt man den jeweils gebundenen Anteil des eingesetzten ^{125}J-Insulins. Aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung erhält man die spezifische Bindung.

3.11.2. Inkubation von Lebermembranen mit ^{125}J-Insulin

Für Bindungsstudien mit Lebermembranen wurden dieselben Ansätze gemacht, wie in 3.11.1. beschrieben, anstelle von Tritonextrakt oder CON A-Eluat wurden Lebermembranen (isoliert nach (191), mit KNaPP 1:16 verdünnt, Proteingehalt ca. 1,5 mg/ml) eingesetzt. ^{125}J-Insulin und natives Insulin wurden in KNaPP/0,1 % Alb/0,045 % Tri (anstelle von 0,03 % Tri) eingesetzt, sodaß die Inkubationen 0,03 % Triton enthielten. Nach Inkubationsende wurden die Membranen ohne PEG-Fällung direkt abzentrifugiert (Minifuge II, 15 Minuten bei 5500 rpm), die Pellets gewaschen und ihre RAdioaktivität bestimmt. PEG-Fällung der Membranen führte zum gleichen Ergebnis.

3.11.3. Inkubation von Hepatocyten

Alle Inkubationen von Hepatocyten wurden in Bechergläsern (150 ml bis 12 ml, 250 ml bis 18 ml und 400 ml bis 30 ml Inkubationsvolumen) oder bei größeren Ansätzen in Kristallisierschalen mit flachem Boden (Durchmesser 13,5 cm) durchgeführt. Die Inkubationsgefäße wurden bei der gewünschten Temperatur im Wasserbad temperiert und mit 70-80 rpm geschüttelt (Minishaker).

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei Typen von Ansätzen verwendet:

i) 1 ml IM/0,5 % Alb mit ^{125}J-Insulin oder ^{125}J-MABI (etwa 2 x 10^6 cpm)
   1 ml IM/0,5 % Alb mit Insulin (0-300 µg/ml)
   8 ml Hepatocytensuspension (1,2 - 1,5 x 10^6 Zellen/ml) in IM/0,1 % Bacitracin

ii) 1 ml IM/0,6 % Alb mit ^{125}J-Insulin oder ^{125}J-MABI (etwa 2,4 x 10^6 cpm)
1 ml IM/0,6 % Alb mit Insulin (0-360 µg/ml)
10 ml Hepatocytensuspension (1,4 - 1,7 x 10^6 Zellen/ml) in IM/0,096 % Bacitracin

Durch Variation dieser Ansätze wurde mit Inkubationsvolumina von 5-190 ml gearbeitet. Alle Inkubationen mit Hepatocyten enthielten also 0,1 % Albumin, 0,08 % Bacitracin (wenn nicht anders angegeben) und etwa 0,08 nM ^{125}J-Insulin. Bei allen Versuchen, in denen Insulineffekte gemessen werden sollten, wurde speziell gereinigtes Albumin (RIA-grade) verwendet.

Für alle Versuche in Gegenwart von Phenylglyoxal, Dansylcadaverin, Cytochalasin B und einigen Versuchen mit Colchicin wurden die Zellen in IM (± Bacitracin) mit den angegebenen Konzentrationen der Agenzien 15-30 Minuten vorinkubiert und dann zur Inkubation nach i) oder ii) eingesetzt. Von Phenylglyoxal und Cytochalasin B wurden Stammlösungen in DMSO verwendet (Phenylglyoxal 183 mg/ml, Cytochalasin B 4,5 mg/ml), Dansylcadaverin wurde in 2 N HCl gelöst (50 mg/ml). Diese Stammlösungen wurden durch Einsatz in die Inkubation mindestens 1:1000 verdünnt.

3.11.3.1. Assoziation von ^{125}J-Insulin oder ^{125}J-MABI

Für Assoziationsexperimente wurden Inkubationen vom Typ i) oder ii) gemacht, die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 30 µg/ml Insulin bestimmt. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden vier Aliquots (je 400 µl, gelegentlich 300, 500 oder 600 µl, Öffnungen der Pipettenspitzen wurden durch Abschneiden erweitert) entnommen. Um die Assoziation zu stoppen, wurden drei der Aliquots in eisgekühlte Polystyrolröhrchen pipettiert und zentrifugiert (10 Minuten im SS 34 bei 12.000 rpm oder 20 Minuten in der Minifuge II bei 5500 rpm, der ersten Variante ist der Vorzug zu geben).

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, das Pellet mit einer Röhrchenfüllung IM oder 0,9 % NaCl (eiskalt) vorsichtig gewaschen und im Gammacounter ausgezählt. Das vierte Aliquot diente zur Kontrolle der eingesetzten Radioaktivität (total counts ≙ 100 %), da sich deren Konzentration insbesondere bei höheren Inkubationstemperaturen durch Verdunstung von Medium veränderte. Die Bindung wurde auf den zum jeweiligen Zeitpunkt bestimmten Wert für die total counts bezogen!

3.11.3.2. Dissoziationsversuche

Je nach Fragestellung wurde die Dissoziation von gebundenem ^{125}J-Insulin (^{125}J-MABI) entweder durch Zugabe einer hohen Konzentration von nativem Insulin zum Inkubationsansatz oder durch Abzentrifugieren der Zellen und Aufnehmen in frisches Medium (mit oder ohne nativem Insulin) erreicht. Die Bestimmung der Bindung erfolgte wie in den Assoziationsversuchen.

Zur Dissoziation mit nativem Insulin (186) wurden zu 10 ml Inkubationsvolumen 2 ml IM/0,1 % Alb mit 180 µg/ml Insulin (30 µg/ml bei Ansätzen, die zur Bestimmung der unspezifischen Bindung bereits 30 µg/ml Insulin enthielten) zugegeben.

Um die Zellen zur Dissoziation in ^{125}J-insulinfreies Medium aufzunehmen, wurden sie abzentrifugiert (450 rpm, Labofuge I oder Minifuge II) und der Überstand vorsichtig dekantiert. Danach wurden sie im ursprünglichen Volumen Dissoziationsmedium (IM/0,1 % Alb/0,08 % Bacitracin, 0, 0,1 oder 51 µM an Insulin) aufgenommen. Unmittelbar vor der Zentrifugation wurde jeweils die erreichte spezifische Bindung bestimmt, auf die dann die spezifischen Bindungen der Dissoziationsphase bezogen wurden. Die während der Dissoziationsphase bestimmten ("Gesamt-")Bindungen wurden als spezifisch angesehen, da das unspezifisch gebundene ^{125}J-Insulin nach 10-20

Minuten mindestens zu 90 % dissoziiert war, sodaß der verbliebene unspezifische Anteil nicht mehr ins Gewicht fällt (siehe schematische Darstellung in Abbildung 2). Die zur Bestimmung der total counts in der Dissoziationsphase entnommenen Aliquots repräsentieren die bei der Assoziation er-

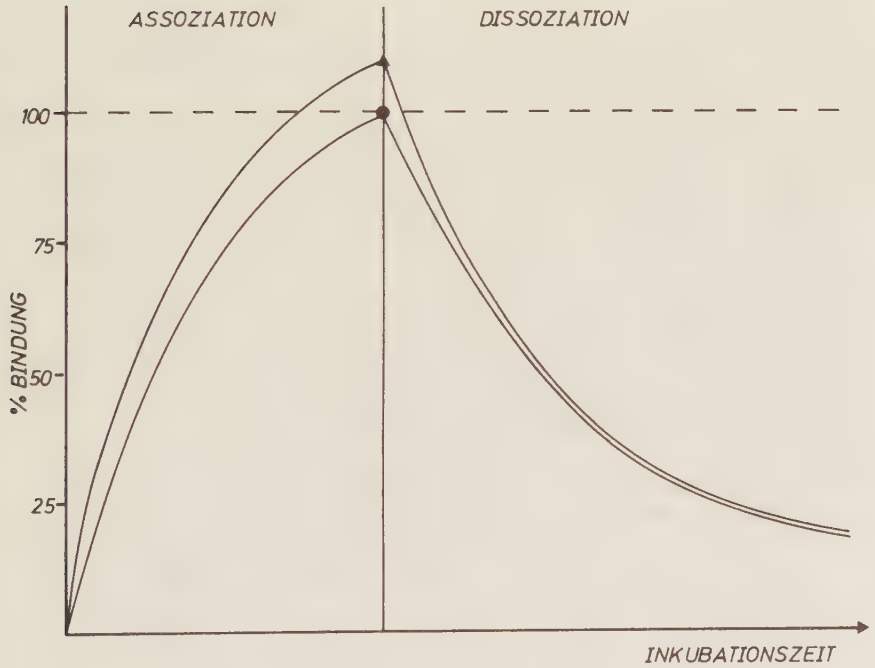


Abb. 2: Schematische Darstellung der Auswertung von Dissoziationsexperimenten, wenn die Dissoziation durch Abzentrifugieren der Zellen und Resuspension in Dissoziationsmedium erreicht wurde (vgl. 3.11.3.2.). Auf der Ordinate ist die Bindung, bezogen auf die während der Assoziation erreichte SB, aufgetragen. Die Darstellung zeigt, daß in der Dissoziationsphase der Unterschied zwischen GB (▲) und SB (●) nach kurzer Zeit nahezu verschwindet.

reichte Gesamtbindung. Nach Berücksichtigung des unspezifischen Anteils können die während der Dissoziation gemessenen Bindungen direkt auf diesen Wert bezogen werden. Eine schematische Darstellung des Verfahrens gibt Abbildung 2.

Alle Dissoziationsversuche wurden bei 28°C durchgeführt, wenn die Assoziationstemperatur höher lag, bei dieser Temperatur.

3.11.3.3. Allgemeines zum Zentrifugieren von Hepatocyten

Immer wenn das Problem auftrat, Hepatocyten vom Inkubationsmedium abzutrennen und anschließend wieder zu suspendieren, wurden sie entweder in der Minifuge II (gekühlt auf 4°C) oder der Labofuge I (Raumtemperatur) 10 Minuten bei 450 rpm abzentrifugiert. Nur bei den Waschschritten nach Isolierung der Zellen wurden kleinere Drehzahlen gewählt (vgl. 3.8.). Die bei Trypsinverdauung entstandenen Zellklumpen (vgl. 3.12.) wurden bei 600 rpm zentrifugiert, da nur so eine saubere Abtrennung des Überstandes möglich war. Kontrollen ohne Verdauung wurden entsprechend zentrifugiert.

Auch wenn die Hepatocyten nicht mehr suspendiert, sondern nur noch tritonextrahiert wurden, wurde nie über 800 rpm zentrifugiert. Bei zu hohen Drehzahlen entstehen zu feste Zellpellets, die sich nur schlecht im Extraktionspuffer suspendieren lassen (vgl. 3.10.1.).

3.11.4. Auswertung von Bindungsdaten

Die Ergebnisse von Verdrängungsexperimenten (Inkubation mit ^{125}J-Insulin und verschiedenen Konzentrationen an nativem Insulin) wurden in Scatcharddiagrammen (286) dargestellt. Zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten wurde ein Compu-

terprogramm für ein iteratives Angleichungsverfahren (maximum likelihood) angewendet. Angeglichen wurde an eine Bindungskurve (gebundener Ligand als Funktion des freien Liganden) unter der Annahme von einer bzw. zwei verschiedenen Bindungsstellen des Rezeptors für Insulin.

3.12. Trypsinverdauung von Hepatocyten

Die von Green und Olefsky (127) für Fettzellen beschriebene Methode, Insulinrezeptoren auf der Zelloberfläche durch Trypsin zu zerstören, wurde auf Hepatocyten übertragen.

Ein Inkubationsansatz von 12 ml (Typ ii, vgl. 3.11.3.) wurde 10 Minuten bei 450 rpm (Minifuge II) zentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml IM suspendiert. Dann wurde 1 ml Trpysinlösung (2,2 mg/ml IM) zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach 10 Minuten wurde mit 1 ml Trypsininhibitorlösung (4 mg/ml IM) gestoppt, die Zellen, die durch die Verdauung verklumpten, in ein eisgekühltes Zentrifugenglas überführt und 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (600 rpm, Minifuge II). Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskaltem IM suspendiert (die Zellklumpen ließen sich nicht auflösen) und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation (Minifuge II, 800 rpm) wurde tritonextrahiert, CON A-gefällt (3.10.) und das CON A-Eluat zum Bindungstest verwendet (3.11.1.). Der parallel inkubierte Kontrollansatz wurde ebenfalls zentrifugiert, in 12 ml IM aufgenommen und ebenfalls 10 Minuten bei 37°C (ohne Trypsin) inkubiert. Danach wurde er in ein eiskaltes Zentrifugenglas überführt, zentrifugiert und das Zellpellet wie bei den verdauten Zellen gewaschen.

Zur Gewinnung von Elektrophoreseproben wurden auch kleine Volumina von Hepatocytensuspensionen trypsinverdaut. Dazu wurde 1 ml aus einem Inkubationsansatz entnommen und nach Zentrifugation in 1 ml IM suspendiert. Zum Starten und Stop-

pen der Verdauung wurden jeweils 100 µl Trypsin- bzw. Trypsininhibitorlösung (s.o.) eingesetzt. Die Waschprozedur wurde wie folgt verändert. Nach Zentrifugation der verdauten Zellen wurde das Pellet in 5 ml IM suspendiert und wieder abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 350 µl H_2O dest. versetzt, suspendiert und eingefroren (vgl. dazu Probenvorbereitung zur Elektrophorese in 3.16.).

3.13. Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors in Hepatocyten

Zur Photoaffinitätsmarkierung wurden Hepatocyten nach 3.11.3. 2-3 Stunden bei 16°C im Dunkeln mit ^{125}J-MABI inkubiert. Anschließend wurde unter Eiskühlung des Inkubationsgefäßes mit einem Abstand von 28 cm 15-20 Minuten von oben belichtet (schütteln). Die kurzwelligen Anteile (unter 300 nm) der UV-Quelle wurden durch 1,5 mm Duranglas herausgefiltert. Nach Abzentrifugieren (10 Minuten bei 450 rpm, Minifuge II oder Labofuge I) wurden die Zellen entweder mit Triton oder Octylglucose extrahiert (vgl. 3.10.), mit H_2O dest. und Probenpuffer zur Elektrophorese vorbereitet (vgl. 3.16.) oder in IM/0,1 % Alb/0,08 % Bacitracin (und ggf. weiteren Agenzien) aufgenommen und weiterinkubiert.

3.14. Gelfiltration des markierten Insulinrezeptors

Nach Photoaffinitätsmarkierung (vgl. 3.13.) und Extraktion des Rezeptors aus Hepatocyten (vgl. 3.10.) wurden die radioaktiven Produkte durch Gelfiltration nach Koch (191) untersucht. Die Extrakte wurden auf eine Säule mit Sepharose CL 6B (1,4 x 120 cm), äquilibriert mit 0,05 M KNaPP/0,1 M NaCl/0,1 % Tri bzw. Octylglucose/0,02 % NaN_3, aufgetragen und in demselben Puffer eluiert. Die Fraktionen (etwa 1,2 ml) wurden im Gammacounter ausgezählt.

3.15. Bestimmung des Insulinabbaus

Um die bei einer Inkubation mit Hepatocyten (vgl. 3.11.3.) abgebaute Menge an ^{125}J-Insulin im Medium grob zu bestimmen, wurden 200 µl aus dem Zellüberstand mit TCA gefällt (189).

Zu dem Zellüberstand wurde zugegeben (alles bei 4°C):

1 ml Albumin (1 %ig in H_2O dest.)
1 ml TCA (10 %ig in H_2O dest.)

Während der TCA-Zugabe wurde geschüttelt. Nach 10 Minuten stehenlassen bei 4°C wurde der Niederschlag abzentrifugiert (10 Minuten bei 5500 rpm, Minifuge II), der Überstand dekantiert und sowohl Niederschlag als auch Überstand im Gammacounter ausgezählt. Der TCA-lösliche Anteil der Radioaktivität (Überstand) wurde auf die Summe aus Niederschlag und Überstand bezogen.

In einer Reihe von Versuchen wurden die Abbauprodukte des ^{125}J-Insulins durch Gelfiltration über Sephadex G50 fine aufgetrennt (237). Dazu wurden 200 µl Zellüberstand mit 20 µl NEM (125 mM in H_2O dest.) versetzt, um den weiteren Insulinabbau zu verhindern und anschließend bis zur Durchführung der Gelfiltration eingefroren. Die Probe wurde vor dem Auftragen auf die Säule (1,1 x 50 cm) mit 100 µl Elutionspuffer (1 M Essigsäure/0,1 % Tri) versetzt.

Entsprechend wurde die zellassoziierte Radioaktivität, d.h. gebundenes und/oder internalisiertes Insulin durch Gelfiltration untersucht. Aus einer Inkubation wurden 1,5 ml abzentrifugiert (10 Minuten bei 450 rpm, Minifuge II) und das Zellpellet in 400 µl 3 M Essigsäure/6 M Harnstoff/0,1 % Tri solubilisiert (7, 309). Der weitere Insulinabbau wurde durch Zugabe von 20 µl 125 mM NEM (s.o.) gestoppt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur (gelegentlich schütteln auf dem Vortex) wurde die Probe eingefroren. Nach Wiederauftauen wurde ungelöstes Material abzentrifugiert (enthält weniger als 5 % der Radioaktivität) und 300 µl des Überstandes auf die Säule aufgetragen.

3.16. SDS-PAGE des Insulinrezeptors

Für die Elektrophorese des photoaffinitätsmarkierten Rezeptors wurde das diskontinuierliche System nach Laemmli (202) verwendet. Neben Gelen (180 x 140 x 1,5 mm) mit einem linearen Gradienten von 4-10 % Acrylamid wurden teilweise Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 7 % benützt. Zur Herstellung der homogenen Trenngele wurde Trenngelpuffer, Acrylamid/Bis und H_2O dest. mit einem Gesamtvolumen von 40 ml zur Polymerisation gebracht. Für Gradientengele wurden im Gradientenmischer je 20 ml Trenngelmischung mit 4 und 10 % Acrylamid verwendet. Die Sammelgele wurden immer mit 4 % Acrylamid gegossen und waren etwa 30 mm lang. In einigen Versuchen wurde das kontinuierliche System nach Fairbanks (86) mit 4 % Acrylamid verwendet. Eine Zusammenstellung der verwendeten Puffer und Lösungen gibt Tabelle 2.

Die Proben des photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptors aus Hepatocyten wurden in zwei Varianten vorbereitet. Entweder wurden die Zellen tritonextrahiert (vgl. 3.10.1.) und der Extrakt mit einem Volumenteil Probenpuffer (s. Tabelle 2) versetzt oder sie wurden nach Abzentrifugieren (10 Minuten bei 450 rpm in der Labofuge I oder Minifuge II) mit H_2O dest. lysiert (etwa 300 µl 10^6 Zellen) und eingefroren. Nach Wiederauftauen wurde ebenfalls mit einem Volumenteil Probenpuffer versetzt. Zur Reduktion von Proben wurde DTE zugegeben, sodaß eine Konzentration von etwa 100 mM erreicht wurde. Für partielle Reduktion wurde Mercaptoethanol in Konzentrationen zwischen 0,4 und 40 mM verwendet. Die so behandelten Proben wurden 2 Minuten gekocht, danach wurden bis zu 80 µl pro Tasche (7-9 mm breit) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophoresen wurden bei konstanter Stromstärke durchgeführt (Laemmli 36 mA/Gel, Fairbanks 46 mA Gel). Nach dem Lauf wurden die Gele entweder sofort oder nach Färbung mit Coomassie Blue getrocknet (bei 90°C im Wasserstrahlvakuum). Die getrockneten Gele wurden zur Autoradiographie verwendet. Weitere Einzelheiten zur Durchführung der Elektrophoresen siehe Kelm (178).

SDS-PAGE nach Laemmli

	Konzentration der verwendeten Lösung	Konzentration im Gel
Elektrodenpuffer		
Tris	0,025 M	
Glycin	0,192 M	
SDS	0,1 %	
Sammelgelpuffer		
Tris/HCl pH 6,8	0,5 M	0,125 M
SDS	0,4 %	0,1 %
Trenngelpuffer		
Tris/HCl pH 8,7	1,5 M	0,375 M
SDS	0,4 %	0,1 %
Acrylamid/Bis		
Acrylamid	40,0 g/100 ml	4, 7 oder 10 %
Bis	1,07 g/100 ml	
Das Verhältnis Acrylamid zu Bis bleibt immer 100 : 2,68		
Zur Polymerisation werden zugegeben:		
Ammoniumpersulfat	10 %	0,1 %
TEMED	unverdünnt	0,06 %

SDS-PAGE nach Fairbanks

Fairbankspuffer		
Tris	0,4 M	0,04 M
Natriumacetat	0,2 M	0,02 M
EDTA	0,02 M	0,002 M
mit Essigsäure auf pH 7,4 einstellen		
SDS in H_2O	10 %	0,1 %
Acrylamid/Bis	wie bei Laemmli	4 %
Start der Polymerisation wie bei Laemmli		
Elektrodenpuffer Fairbankspuffer mit SDS, Konzentrationen wie im Gel		

Probenpuffer für Laemmli und Fairbanks

		Konzentration in der Probe
SDS	10 %	5 %
Glycerin	20 %	10 %
Tris/HCl pH 6,8	0,125 M	0,0625 M
EDTA	1 mM	0,5 mM
Bromphenolblau	0,002 %	0,001 %

Tabelle 2: Puffer und Lösungen für die Elektrophorese

Molekulargewichtsbestimmungen wurden in der SDS-PAGE nach Laemmli vorgenommen, wie von Kelm (178) beschrieben.

3.17. Autoradiographie

Die zur Autoradiographie verwendeten Röntgenfilme wurden mit den getrockneten Elektrophoresegelen in Röntgenkassetten belichtet. Mit den in 3.4. angegebenen Verstärkerfolien wurden die Kassetten bei -30°C bis zu 40 Tagen oder bei -80°C bis zu 14 Tagen belichtet.

3.18. Proteinbestimmung

Wegen der Gegenwart von Triton und gelegentlich kleiner Proteinkonzentrationen wurde für die aus Hepatocyten erhaltenen Tritonextrakte die Proteinbestimmung nach Peterson (256) angewandt. Die Durchführung ist in (161) beschrieben.

3.19. Darstellung von Meßergebnissen

Assoziations- und Dissoziationskurven geben im allgemeinen die Messungen aus einem repräsentativen Experiment wieder. Für die Darstellung von Insulinabbaudiagrammen und Scatcharddiagrammen gilt dasselbe. Werden verschiedene Kurven in einem Diagramm verglichen, so wurden sie aus einer Hepatocytenpräparation parallel bestimmt (Ausnahmen sind gekennzeichnet). In manchen Diagrammen sind Mittelwerte aus unabhängigen Experimenten angegeben (ebenfalls gekennzeichnet).

4. ERGEBNISSE

4.1. Bindung von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten

4.1.1. pH-Abhängigkeit

Isolierte Hepatocyten können in Suspension am besten überleben, wenn die Inkubation bei physiologischem pH 7,4 durchgeführt wird. Da jedoch das pH-Optimum der Insulinbindung an den Rezeptor im Bereich von pH 7,8 - 8,2 liegt (136, 180, 191, 192, 241, 333), wurde die pH-Abhängigkeit der Bindung von ^{125}J-Insulin bei 23°C untersucht, um den besten Kompromiß zwischen optimalem Überleben der Zellen und größtmöglicher Insulinbindung zu erreichen.

In dem routinemäßig zur Inkubation verwendeten IM (Tabelle 1) wurde die HEPES-Konzentration von sonst 10 mM auf 40 mM erhöht (statt 8 g/l wurden dabei nur 6,25 g/l NaCl eingesetzt), um auch die eingestellten alkalischen pH-Werte über zwei Stunden aufrecht erhalten zu können. Die Abb. 3 zeigt, daß oberhalb von pH 7,4 die spezifische Bindung in der zweiten Stunde der Inkubation wieder abnimmt. Nach zwei Stunden Inkubation durchgeführte Vitalitätstests mit Trypanblau erklären diesen Effekt, denn im alkalischen Bereich nimmt die Vitalität der Hepatocyten stark ab. Bei pH 8,3, wo auch die spezifische Bindung am stärksten abfällt, sind nach zwei Stunden nur noch 70 % der Zellen vital, bei pH 6,8 dagegen noch über 90 %.

Die Bindung von ^{125}J-Insulin besitzt zwar ein Maximum bei etwa pH 8, bei alkalischen pH-Werten lassen sich aber wegen der abnehmenden Vitalität der Hepatocyten Versuche allenfalls mit kurzen Inkubationszeiten durchführen. Daher wurde für alle Inkubationen pH 7,4 verwendet, da auch bei Inkubationszeiten von 4-5 Stunden bei 16 oder 23°C die Vitalität mit größer 90 % erhalten blieb.

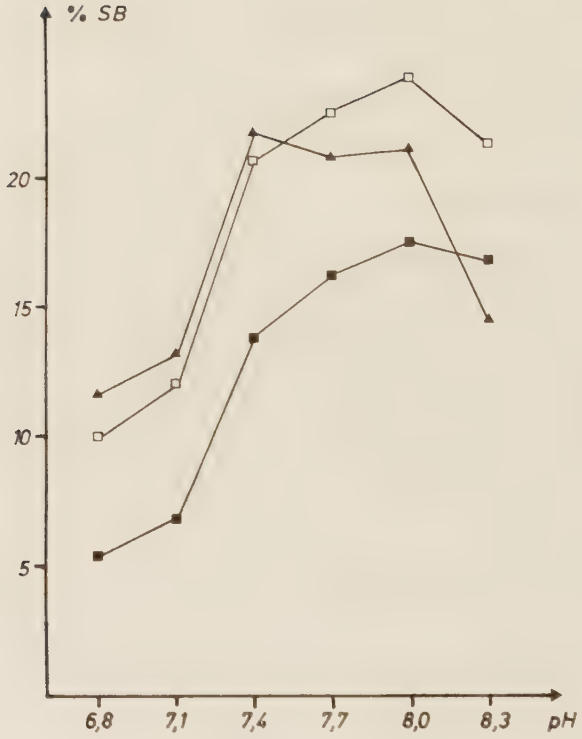


Abb. 3: pH-Abhängigkeit der Bindung von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten bei 23°C. Die SB wurde bei den verschiedenen pH-Werten nach Inkubationszeiten von 20 (■), 60 (□) und 120 (▲) Minuten bestimmt.

4.1.2. Assoziation von ^{125}J-Insulin bei verschiedenen Temperaturen

In den Abb. 4 und 5 ist die Bindung von ^{125}J-Insulin an isolierte Hepatocyten bei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Der jeweilige Kurvenverlauf hängt dabei im einzelnen Experiment entscheidend von der Vitalität der Hepatocyten und der Qualität (d.h. vom Alter, vgl. (191)) des ver-

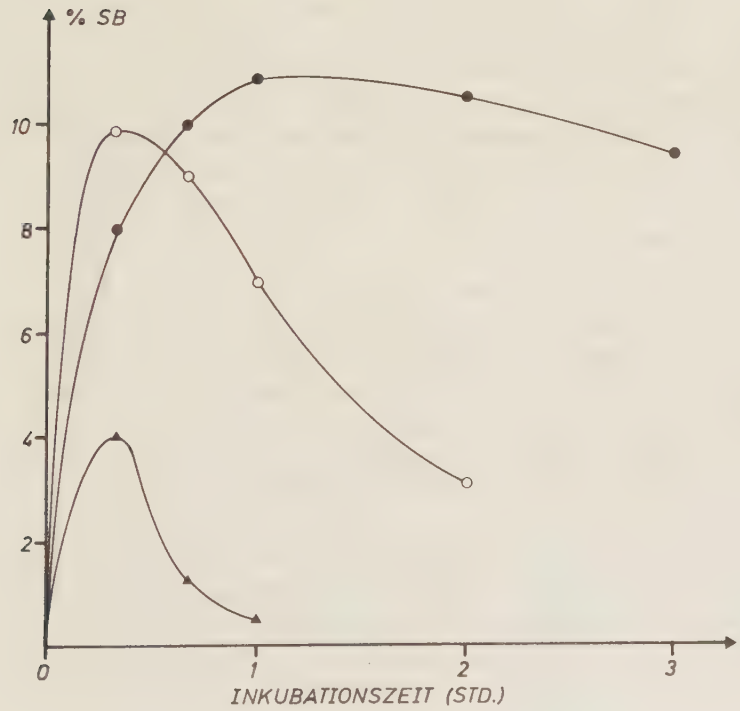


Abb. 4: Assoziation von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten ohne Bacitracin im Inkubationsmedium. Die Kurven zeigen die Assoziation bei 16 (●), 23 (○) und 30°C (▲) und wurden aus verschiedenen Zellpräparationen aufgenommen.

wendeten ^{125}J-Insulins ab. Daher ist es zwar nicht möglich, eine Assoziationskurve quantitativ zu reproduzieren, ein qualitativer Vergleich der verschiedenen Assoziationsbedingungen ist jedoch möglich.

Die Assoziation bei nicht inhibiertem Insulinabbau (vgl. 4.3.), d.h. ohne Bacitracin im Inkubationsmedium, führt bei 23 oder 30°C nicht zu einem Bindungsgleichgewicht, nach einem Bindungsmaximum nach etwa 30 bzw. 20 Minuten nimmt die spezifische Bindung rapide ab (Abbildung 4). Dafür ist in erster Linie der Abbau des ^{125}J-Insulins verantwortlich, bei 30°C spielt vermutlich auch der Rezeptorabbau eine Rolle (vgl. 4.10.). Auch bei 16°C werden noch deutliche Mengen an ^{125}J-Insulin abgebaut, woraus ersichtlich wird, daß das Plateau zwischen einer Inkubationszeit von einer und zwei Stunden nur ein scheinbares Gleichgewicht darstellen kann. Dies wird durch die Inkubation in Gegenwart von Bacitracin bestätigt, in der bei 16°C erst nach 3-4 Stunden ein Bindungsgleichgewicht erreicht wird (Abbildung 5).

Auch bei Inkubation mit Bacitracin als Inhibitor des Insulinabbaus ist bei höheren Temperaturen kein Bindungsgleichgewicht zu erreichen (Abbildung 5). Dafür ist der bei 37°C beobachtete Rezeptorabbau (4.10.) verantwortlich zu machen, außerdem ist bei 37°C der Insulinabbau mit Bacitracin nicht mehr vollständig inhibiert (Abbildung 11 E). Bei 16°C ist nach 3-4 Stunden, bei 23°C nach 2-3 Stunden ein Bindungsgleichgewicht erreicht. Die spezifischen Bindungen im Gleichgewicht lagen bei beiden Temperaturen bei 18-27 %. Bei Versuchen, in denen eine möglichst große Insulinbindung erreicht werden sollte, wurde daher bei 23°C inkubiert. Wenn gleichzeitig Internalisierung des ^{125}J-Insulins (4.7.) unerwünscht war, wurde bei 16°C inkubiert.

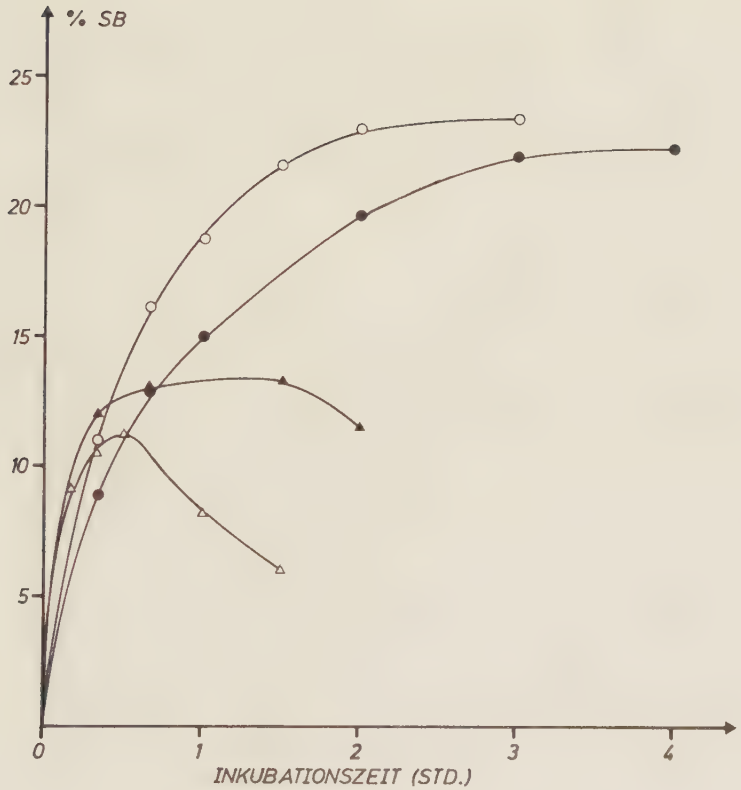


Abb. 5: Assoziation von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten in Gegenwart von Bacitracin (0,8 mg/ml). Gezeigt ist die Assoziation bei 16 (●), 23 (○), 30 (▲) und 37°C (△). Die Assoziation wurde mit verschiedenen Hepatocytenpräparationen gemessen.

4.1.3. Dissoziationskonstanten des Insulin-Rezeptor-Komplexes

Zur Bestimmung von Dissoziationskonstanten des Insulin-Rezeptor-Komplexes ist es erforderlich, daß ein Bindungsgleichgewicht zwischen Ligand und Rezeptor erreicht wird. Bei der Inkubation von Hepatocyten mit ^{125}J-Insulin und Insulin gibt es einige Faktoren, die ein solches Gleichgewicht stören:

i) Insulinabbau
ii) Internalisierung von Insulin
iii) Rezeptorabbau
iv) Absinken des pH-Wertes im Inkubationsmedium

Die Versuche, die zu den Problempunkten i - iii durchgeführt wurden, sind in den Abschnitten 4.3., 4.7. und 4.10. dargestellt. Nach den dort ausgeführten Ergebnissen kann ein Bindungsgleichgewicht erreicht werden, wenn der Insulinabbau mit Bacitracin inhibiert wird und durch Inkubation bei 16°C sowohl die Internalisierung von Insulin als auch der Rezeptorabbau verhindert werden. Die pH-Abnahme betrug bei 23°C im Zeitraum von zwei Stunden maximal 0,1 Einheiten. Bei 16 und 23°C konnte eine Abnahme der spezifischen Bindung bei längerdauernden Inkubationen (bis zu 280 Minuten, vgl. auch Abbildung 5) beobachtet werden, was bei einer pH-Abnahme von 0,2 Einheiten oder mehr zu erwarten wäre (vgl. Abbildung 3).

In Abbildung 6 sind Scatcharddiagramme (286) aus Verdrängungsexperimenten mit ^{125}J-Insulin bzw. ^{125}J-MABI und nativem Insulin gezeigt. Das der Computersimulation zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten zugrunde liegende Modell (vgl. 3.11.4.) wurde durch die Annahme zweier Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität besser erfüllt als unter der Annahme einer Bindungsstelle. Für die beiden Dissoziationskonstanten ergaben sich aus den drei in Abbildung 6 gezeigten Kurven Werte von 0,20 - 0,28 nM bzw. 6,1 - 7,9 nM.

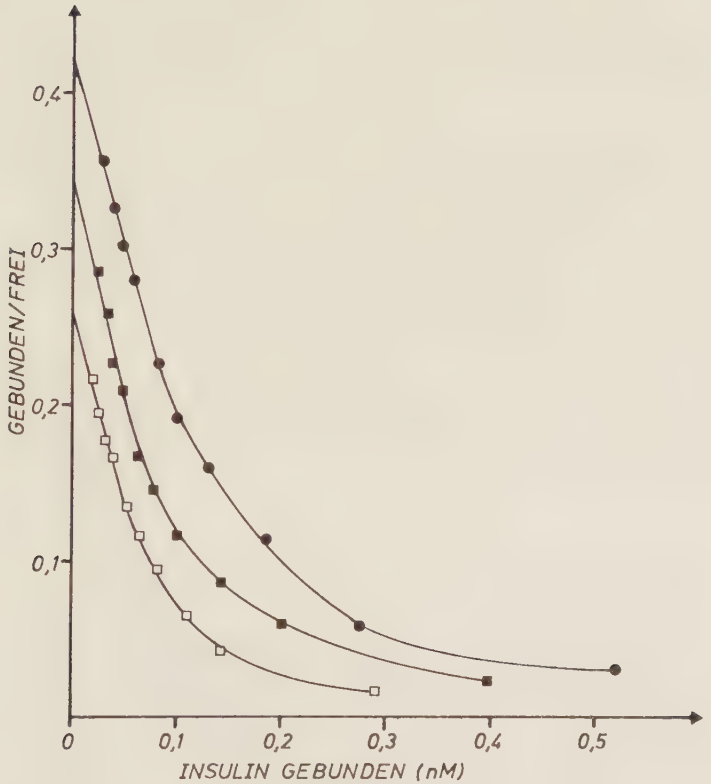


Abb. 6: Scatcharddiagramme der Insulinbindung an den Insulinrezeptor in Hepatocyten. Die Zellen wurden 4 Stunden bei 16°C mit ^{125}J-Insulin (●) und verschiedenen Konzentrationen an nativem Insulin inkubiert. Die Punkte der Kurven geben den Bereich von 0-17 nM Insulin wieder. Zum Vergleich sind zwei Kurven aus einer zweiten Zellpräparation eingezeichnet (■ □), die mit ^{125}J-MABI als Tracerinsulin gemessen wurden. Dabei ist der Effekt von 10 mM Colchicin (□) auf die Bindung gezeigt. Alle Meßpunkte wurden vierfach bestimmt.

Sowohl die Abbildung 6 als auch die Computersimulation zeigen, daß selbst die hier verwendete hohe Colchicinkonzentration von 10 mM (vgl.4.7.1.4.) keinen Einfluß auf die Dissoziationskonstanten des Insulin-Rezeptor-Komplexes hat.

Dissoziationskonstanten wurden außerdem in CON A-Eluaten von Rezeptorextrakten aus Hepatocyten (vgl. 3.10.) bestimmt, um die Bindungseigenschaften des Insulinrezeptors nach verschiedenen Vorgeschichten der Hepatocyten zu vergleichen. Auch hier wurde das Modell der Computersimulation unter der Annahme zweier Bindungsstellen besser erfüllt. Die Bedeutung der zweiten Bindungsstelle ist jedoch unklar, da in verschiedenen unabhängigen Versuchen für deren Dissoziationskonstante stark abweichende Werte (6-195 nM!) erhalten wurden. Die Dissoziationskonstanten für die höheraffine Bindungsstelle sind in Tabelle 5 (s.S. 88) zusammengefaßt.

4.2. Dissoziation von zellgebundenem ^{125}J-Insulin

Geht man davon aus, daß ^{125}J-Insulin eine reversible Bindung mit dem Rezeptor eingeht, so muß zellgebundenes ^{125}J-Insulin durch Zugabe eines hohen Überschusses an nativem Insulin aus seiner Bindung verdrängt werden können. Erste Dissoziationsversuche wurden durchgeführt, um den Nachweis zu erbringen, daß durch Photolyse eines zellgebundenen photoreaktiven ^{125}J-Insulinderivats eine kovalente und damit nicht dissoziierbare Bindung hergestellt werden kann. Zwar konnte gezeigt werden, daß durch Photoreaktion tatsächlich eine solche kovalente Bindung entsteht (186), aber auch in Kontrollexperimenten (Dissoziation von photoreaktivem ^{125}J-Insulin ohne Photolyse bzw. Dissoziation von ^{125}J-Insulin) konnte eine vollständige Dissoziation nicht erreicht werden. In einigen weiteren Versuchen wurde das Dissoziationsverhalten von ^{125}J-Insulin näher untersucht, wobei die Dissoziation dadurch erreicht wurde, daß die Zel-

Zellen abzentrifugiert und in frisches (^{125}J-insulinfreies) Medium aufgenommenwurden (s.u.). Der Verlauf der Dissoziation wurde in Abhängigkeit von der Assoziationszeit, der Assoziationstemperatur und der Konzentration an nativem Insulin im Dissoziationsmedium getestet.

Wie verschiedene Autoren berichten (66, 78, 245), wird die Dissoziation des ^{125}J-Insulins vom Rezeptor durch natives Insulin beschleunigt. Abbildung 7 zeigt die Dissoziation bei 28°C in Gegenwart verschiedener Insulinkonzentrationen. Alle Ansätze wurden zuerst eine Stunde bei 23°C mit ^{125}J-Insulin inkubiert, anschließend zentrifugiert und das Zell-

Abb. 7: Dissoziation von zellgebundenem ^{125}J-Insulin in Gegenwart verschiedener Insulinkonzentrationen. Nach Assoziation bei 23°C wurden die Zellen abzentrifugiert und bei 28°C in frisches (^{125}J-insulinfreies) Medium aufgenommen und ohne Insulin (●) oder in Gegenwart von 0,1 (○), 1 (■), 10 (□), 100 (△) oder 1000 nM (▲) nativem Insulin weiterinkubiert.

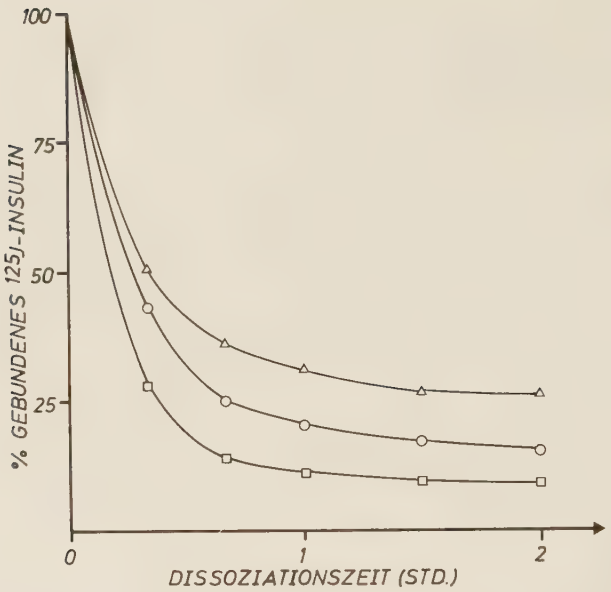


Abb. 8: Dissoziation von zellgebundenem ^{125}J-Insulin bei 37°C nach verschiedenen Assoziationszeiten. Nach 10 (□), 30 (○) oder 50 (△) Minuten Assoziation bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem (^{125}J-insulinfreiem) Medium (100 nM natives Insulin) weiterinkubiert (37°C).

pellet in Dissoziationsmedium (28°C) mit den angegebenen Insulinkonzentrationen aufgenommen. Mit steigenden Konzentrationen wurde die Dissoziationsgeschwindigkeit größer, ab 10-100 nM Insulin läßt sie sich nicht mehr weiter steigern. Da in diesen Versuchen keine unendliche Verdünnung erreicht wird, stellt sich während der Dissoziation ein neues Bindungsgleichgewicht ein. Das hat zur Folge, daß nach drei Stunden Dissoziationszeit die Bindung von ^{125}J-Insulin umso größer ist, je weniger natives Insulin im Dissoziationsmedium ist. Um möglichst schnelle und vollständige Dissozia-

tion von ^{125}J-Insulin zu erreichen, enthielten die routinemäßig verwendeten Dissoziationsmedien daher 100 nM, in älteren Experimenten teilweise auch 5,1 µM natives Insulin.

In Abbildung 8 ist zu sehen, daß der nicht dissoziierbare Anteil an zellgebundenem ^{125}J-Insulin umso größer ist, je länger bei 37°C inkubiert wurde. Entsprechende Beobachtungen wurden auch bei 23 und 30°C gemacht. Im Unterschied dazu konnten nach Inkubation bei 16°C immer 90-95 % des spezifisch gebundenen ^{125}J-Insulins wieder abdissoziiert werden (Abbildung 9).

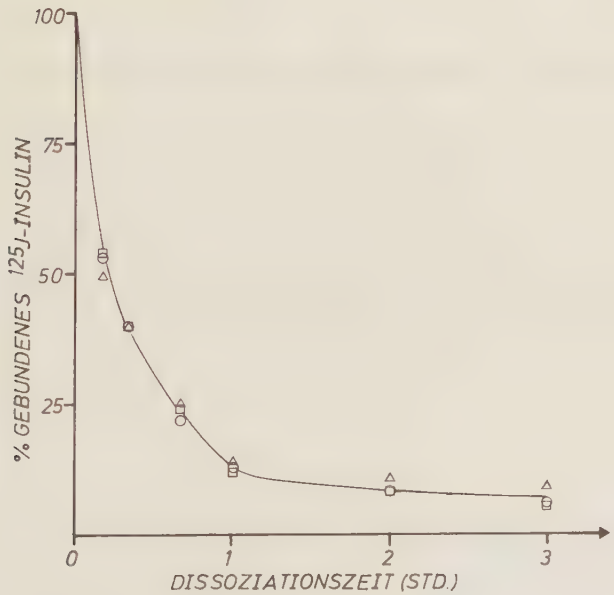


Abb. 9: Wie Abbildung 8, jedoch Assoziation bei 16°C, Dissoziation bei 28°C.

Dieses temperatur- und zeitabhängige Entstehen einer nicht dissoziierbaren Insulinbindung kann verschiedene Ursachen haben:

i) ^{125}J-Insulin ist internalisiert worden
ii) Es ist eine kovalente ^{125}J-Insulin-Rezeptor-Bindung entstanden
iii) ^{125}J-Insulin dissoziiert nur noch extrem langsam

Die Untersuchungen zu den Möglichkeiten i und ii sind in den Abschnitten 4.6. und 4.7. gezeigt. Die Möglichkeit iii wird im Abschnitt 5.3.1. diskutiert.

4.3. Abbau von ^{125}J-Insulin durch Hepatocytensuspensionen

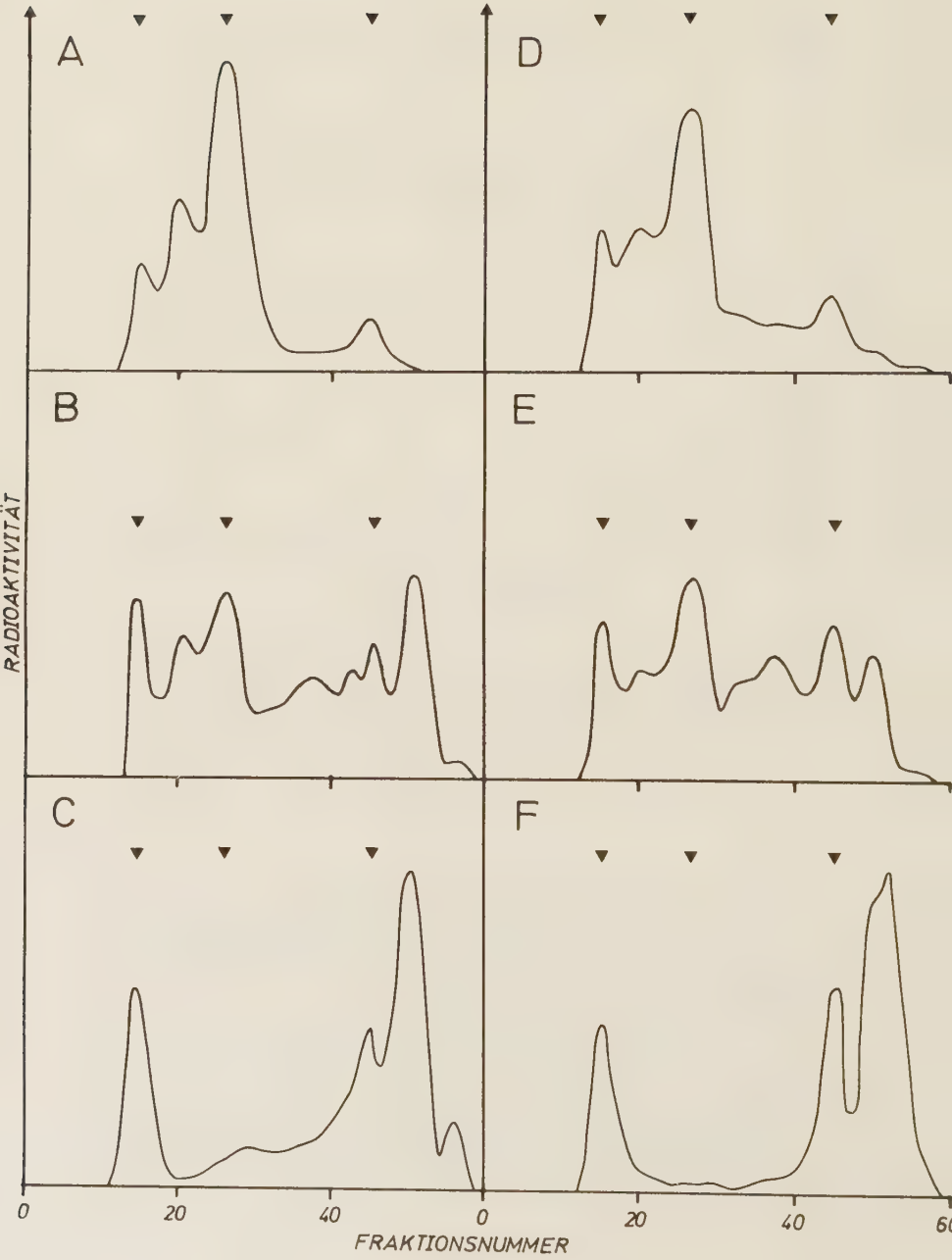
In Abbildung 10 ist das Entstehen von TCA-löslichen Abbauprodukten von ^{125}J-Insulin während der Inkubation von Hepatocyten mit ^{125}J-Insulin bei verschiedenen Temperaturen gezeigt. Bei 16°C ist gegenüber den höheren Temperaturen eine deutliche Abnahme der Abbaugeschwindigkeit zu beobachten. Durch Zugabe von Bacitracin (0,8 mg/ml) läßt sich der Insulinabbau bei 23°C faßt vollständig hemmen.

Mit der Methode der TCA-Fällung wird der Insulinabbau unterschätzt, da Abbauprodukte wie die Insulin-A-Kette TCA-fällbar sind (237). Daher wurden die Abbauprodukte auch durch Gelfiltration untersucht. Die Elutionsprofile zeigen, daß ^{125}J-Insulin im Zellüberstand zugunsten verschiedener niedermolekularer Produkte verschwindet (Abbildung 11 A-C, F). Auch hier zeigt sich, daß Bacitracin bei 23°C ein wirksamer Abbauinhibitor ist (Abbildung 11 D). Lediglich bei 37°C ist auch in Anwesenheit von Bacitracin Insulinabbau zu beobachten (Abbildung 11 E). Wurde der Zellüberstand abgetrennt und anschließend das zellgebundene ^{125}J-Insulin in frisches Medium dissoziiert, so findet man bei Gelfiltration der dissoziierten Radioaktivität wesentlich mehr intaktes ^{125}J-

Abb. 10: Abbau von ^{125}J-Insulin bei Inkubation mit Hepatocyten. Gezeigt ist die Zunahme TCA-löslicher Produkte während Inkubation bei 16 (△), 23 (○●) und 30°C (□). Außerdem ist die Inhibition des Insulinabbaus durch Bacitracin dargestellt (●). Die Meßwerte für die einzelnen Kurven stammen aus verschiedenen Zellpräparationen.

Insulin als in den Zellüberständen (Abbildung 11 G). Die nicht dissoziierbare Radioaktivität, die nach Solubilisieren der Zellpellets untersucht wurde, bestand weitgehend aus intaktem ^{125}J-Insulin (Abbildung 11 H).

Der in allen Elutionsprofilen auftauchende Peak im Ausschlußvolumen besteht aus höhermolekularem Material, welches durch Disulfidaustausch mit ^{125}J-Insulin entstanden sein könnte. Er entsteht auch beim "Altern" von ^{125}J-Insulin (237).


A
D
B
E
C
F
RADIOAKTIVITÄT
0
20
40
0
20
40
60
FRAKTIONSNUMMER

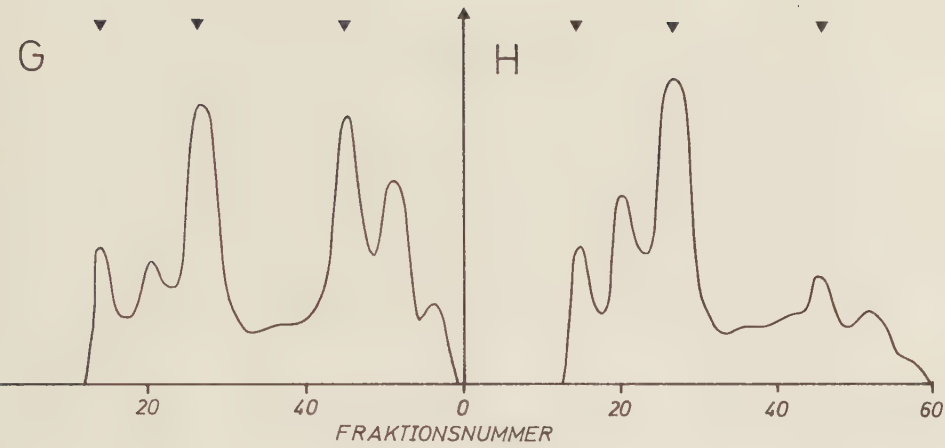


Abb. 11: Gelfiltration von ^{125}J-Insulin und Abbauprodukten. Nach verschiedenen Inkubationsbedingungen wurde die Radioaktivität in Zellüberständen und die zellassoziierte Radioaktivität über Sephadex G50 fine aufgetrennt. Die drei Pfeile markieren das Ausschlußvolumen, den Insulinhauptpeak und den Salzpeak. In dem gewählten Elutionspuffer (1 M Essigsäure/0,1 % Tri) spaltet ^{125}J-Insulin in zwei Peaks auf (kleiner Peak vor dem Hauptpeak), vermutlich wegen verschieden jodierter Insuline (237). Jodtryrosin und kleine jodierte Peptide eluieren hinter dem Salzpeak.
Die einzelnen Abbildungen zeigen:
A) ^{125}J-Insulin ohne Inkubation
B) Zellüberstand nach einer Stunde bei 16°C
C) Zellüberstand nach einer Stunde bei 23°C
D) Zellüberstand nach einer Stunde bei 23°C in Gegenwart von Bacitracin (0,8 mg/ml)
E) Wie D), jedoch bei 37°C
F) Zellüberstand nach 20 Minuten bei 37°C
G) Zellgebundene, nach einer Stunde Inkubation bei 23°C von Hepatocyten abdissoziierte Radioaktivität
H) Nicht dissoziierbare, zellassoziierte Radioaktivität nach einer Stunde Inkubation bei 23°C.

Das Fehlen von Abbauprodukten in der Zelle kann daher rühren, daß diese sofort ins Medium abgegeben werden (38, 310). Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß alle Abbauaktivität im Zellüberstand lokalisiert ist. Abbildung 12 zeigt, daß die Abbaukapazität des Inkubationsmediums nach Abtrennen der Zellen nahezu so groß ist wie die der Zellsuspension. Da die Abbauenzyme durch "Ausbluten" aus den Zellen ins Medium gelangen, muß man jedoch berücksichtigen, daß die beiden Kurven nicht uneingeschränkt vergleichbar sind. Zur Bestimmung der Abbaukapazität des Zellüberstandes wur-

Abb. 12: Abbauaktivität im Zellüberstand von Hepatocytensuspensionen. Hepatocyten wurden eine Stunde bei 23°C ohne ^{125}J-Insulin inkubiert und dann abzentrifugiert. Der Zellüberstand wurde mit ^{125}J-Insulin inkubiert, nach verschiedenen Zeiten wurde die TCA-Löslichkeit der Radioaktivität bestimmt (o). Zum Vergleich ist der ^{125}J-Insulinabbau einer Zellsuspension bei 23°C gezeigt (●). Weitere Erläuterungen im Text.

den parallel zu einem Abbautest bei 23°C Hepatocyten ohne ^{125}J-Insulin ebenfalls bei 23°C inkubiert und nach einer Stunde abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann, wie in 3.11.3. angegeben, anstelle einer Hepatocytensuspension mit ^{125}J-Insulin (in IM/0,1 % Alb, da der Zellüberstand schon 0,1 %ig an Albumin war) inkubiert. Aus dieser Versuchsanordnung ergibt sich, daß die aus den Leberzellen ausblutende Abbauaktivität über eine Stunde gesammelt wurde, sodaß diese zu Beginn des Abbautests größer ist als im Medium der verglichenen Zellsuspension. Die Differenz der zwei Kurven in Abbildung 12 dürfte also größer sein als hier bestimmt. Sie zeigt, daß neben dem Abbau im Medium auch zellvermittelter Abbau stattfinden muß. Nach den Ergebnissen aus 11 H bedeutet das, daß die Abbauprodukte aus dem zellulären Abbau ins Medium abgegeben werden müssen.

Da NEM als Inhibitor des Insulinabbaus bekannt ist (29, 99), wurde seine Brauchbarkeit bei Inkubationen mit Hepatocyten bei 23°C getestet. Wie zu erwarten, konnte NEM (1 mM) den Insulinabbau weitgehend inhibieren, allerdings wurde ein kontinuierliches Ansteigen der unspezifischen Bindung während der Assoziation von ^{125}J-Insulin beobachtet. Der Grund hierfür liegt in einer irreversiblen Schädigung der Hepatocyten, die nach zweistündiger Inkubation zu über 90 % mit Trypanblau färbbar waren. NEM ist damit als Abbauinhibitor bei Inkubationen mit Hepatocyten ungeeignet, trotzdem wird es von manchen Autoren verwendet (82, 261, 343).

Wenn nicht anders vermerkt, wurde in allen Experimenten mit Hepatocyten Bacitracin im Inkubationsmedium eingesetzt. Neben der Inhibierung des Insulinabbaus wurde dadurch die unspezifische Bindung von 4-6 % ohne Bacitracin auf 1-2 %, jeweils auf die eingesetzte Radioaktivität bezogen, gesenkt.

4.4. Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors

4.4.1. Darstellung und Eigenschaften von MABI und DABI

Die nach Yip et al. (186, 339) hergestellten Azidobenzoylinsuline wurden über SP-Sephadex C25 getrennt (340) und nach Reinigung charakterisiert (1, 340). Nach den Aminosäureanalysen der Fluordinitrobenzolderivate handelt es sich bei den in Abbildung 1 mit III und IV bezeichneten Peaks um DABI (III) und MABI (IV). Von Yip et al. (340) wurden dieselben Derivate charakterisiert. Bei der von Yip et al. durchgeführten Präparation ist ein großer Peak im Ausschlußvolumen (überschüssige aktivierte 4-Azidobenzoesäure oder Hydrolyseprodukte des aktivierten Esters) und ein weiterer Peak mit Tri(azidobenzoyl)insulin zu sehen. In der hier durchgeführten Präparation sind die entsprechenden Peaks (I und II) nur andeutungsweise zu erkennen, da die Derivatisierung, bezogen auf die Aminogruppen des Insulins, mit äquimolaren Mengen an aktiviertem Ester der 4-Azidobenzoesäure durchgeführt wurde. Daraus resultiert gleichzeitig eine bessere Ausbeute an MABI, da weniger mehrfach substituierte Produkte entstehen. Durch nicht umgesetztes Insulin erscheint gelegentlich andeutungsweise ein Peak V.

Zur Aufnahme von Verdrängungskurven können anstelle des nativen Insulins (vgl. 3.11.1.) Insulinderivate verwendet werden. Durch Vergleich der K_{50}-Werte (das sind die Konzentrationen an Insulin bzw. Insulinderivat, mit denen die Hälfte des ^{125}J-Insulins aus seiner Rezeptorbindung verdrängt wird) kann die Bindungsaffinität der Derivate im Verhältnis zu nativem Insulin bestimmt werden (189). In Übereinstimmung mit Yip et al. (340) wurde aus Verdrängungskurven für MABI eine Bindungsaffinität von etwa 40 %, für DABI von etwa 10 % der Affinität von nativem Insulin bestimmt. Im RIA war MABI zu 100 %, DABI zu 25 % immunoreaktiv (nicht gezeigt).

4.4.2. Markierungsversuche mit ^{125}J-MABI und ^{125}J-DABI

In einigen Vorversuchen wurde der Insulinrezeptor in CON A-Eluaten sowohl mit ^{125}J-MABI als auch mit ^{125}J-DABI (jodiert wie MABI, vgl. 3.6.) photoaffinitätsmarkiert. Da ^{125}J-DABI zwei photoreaktive Gruppen am Lysin-B-29 und Glycin-A-1 enthält, sollte geprüft werden, ob damit eine größere Markierungsausbeute als mit ^{125}J-MABI (photoreaktive Gruppe am Lysin-B-29) erreicht werden kann. Es zeigte sich, daß von beiden Photoaffinitätsmarkern 40-50 % vom spezifisch Gebundenen nach Photolyse nicht mehr dissoziierbar waren (bis zu drei Stunden bei 37°C in Gegenwart von 5,1 µM nativem Insulin), d.h. kovalent gebunden bleiben. Da jedoch die spezifische Bindung mit ^{125}J-MABI doppelt so hoch wie mit ^{125}J-DABI war, konnte also mit ersterem eine doppelt so große absolute Markierungsausbeute erreicht werden. Für alle Untersuchungen mit Hepatocyten wurde daher ausschließlich ^{125}J-MABI verwendet.

Im Vergleich zu meiner Diplomarbeit (186) wurde die Inkubationstechnik für die Hepatocyten verbessert. Damit verbunden wurden mit ^{125}J-Insulin und ^{125}J-MABI sowohl höhere spezifische Bindungen als auch größere Markierungsausbeuten bei Photoaffinitätsmarkierungen des Insulinrezeptors erzielt. Üblicherweise konnten 35-50 % der in der Assoziationsphase erreichten spezifischen Bindung (11-23 %) durch Photolyse in eine kovalente Bindung überführt werden (Abbildung 13). Die Markierungsausbeute lag damit im Vergleich zu anderen Autoren (90, 146, 329) höher.

Abb. 13: Dissoziation von ^{125}J-MABI bei 28°C. Nach zwei Stunden Assoziation bei 16°C im Dunkeln wurde ein Inkubationsansatz belichtet (●), während die Kontrolle weiter im Dunkeln gehalten wurde (○). Danach wurden beide Ansätze abzentrifugiert und in Dissoziationsmedium mit 100 nM Insulin aufgenommen und weiterinkubiert (Kontrolle im Dunkeln).

4.4.3. Zellfraktionierung nach Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors

Die Extraktion einer durch Zellfraktionierung gewonnenen mikrosomalen, gewöhnlich nicht näher charakterisierten Membranfraktion mit Triton-X-100 ist ein weitverbreitetes Routineverfahren, um den Insulinrezeptor im zellfreien System untersuchen zu können (vgl. 1.1.). Da die Insulinrezeptoren auf verschiedene Zellkompartimente verteilt sind (vgl. 1.2.

und 4.8.), ist mit diesem Verfahren nur ein Teil der Rezeptoren zu gewinnen. Eine Bestimmung der Rezeptorverteilung ist durch Bindungstests mit ^{125}J-Insulin in den einzelnen Zellfraktionen der Präparation möglich. Die erhaltenen spezifischen Bindungen sind jedoch nur schwer vergleichbar, da sich die einzelnen Fraktionen im Bindungsverhalten insbesondere wegen unterschiedlicher Insulinabbauaktivität und unterschiedlichem Proteingehalt massiv unterscheiden.

Ein anderer Weg, zumindest die Ausbeute an Rezeptoren aus der Plasmamembran, wo 80-85 % der Rezeptoren lokalisiert sind (vgl. 4.8.), abzuschätzen, besteht darin, daß die Zellen vor der Fraktionierung photoaffinitätsmarkiert werden. Durch Auszählen im Gammacounter kann die Verteilung des markierten Rezeptors auf die verschiedenen Fraktionen verfolgt werden. Allerdings kann auch dieses Verfahren nur Anhaltspunkte bieten, da die Photoaffinitätsmarkierung als Ausgangsmaterial isolierte Hepatocyten erfordert. Damit unterscheidet es sich im ersten Schritt, dem Homogenisieren, wesentlich von einer Routinepräparation (vgl. 3.7.), da Einzelzellen in Suspension sich nicht so gut homogenisieren lassen wie eine zerkleinerte Leber.

Die Abbildung 14 zeigt die Verteilung der Radioaktivität nach Fraktionierung photoaffinitätsmarkierter Zellen (vgl. 3.9.) auf die einzelnen Fraktionen. Die Darstellung zweier unabhängiger Präparationen zeigt Unterschiede in der Verteilung vor allem in den ersten beiden Zentrifugationsschritten. Diese sind vermutlich auf unterschiedliche Homogenisation zurückzuführen. Im Tritonextrakt aus den mikrosomalen Membranen erhält man nach der 100.000 g Zentrifugation etwa 5 % der spezifisch gebundenen Radioaktivität (P1 + Ü1 ≙ 100 %). Berücksichtigt man, daß nur etwa die Hälfte der spezifischen Bindung kovalent ist und die nicht kovalent gebundene Radioaktivität während der Präparation abdissoziieren kann, so kann die Rezeptorausbeute bis zu etwa 10 % der Plasmamembranrezeptoren betragen. Dieses Ergebnis stimmt mit der von Deger (65) gefundenen Kontamina-

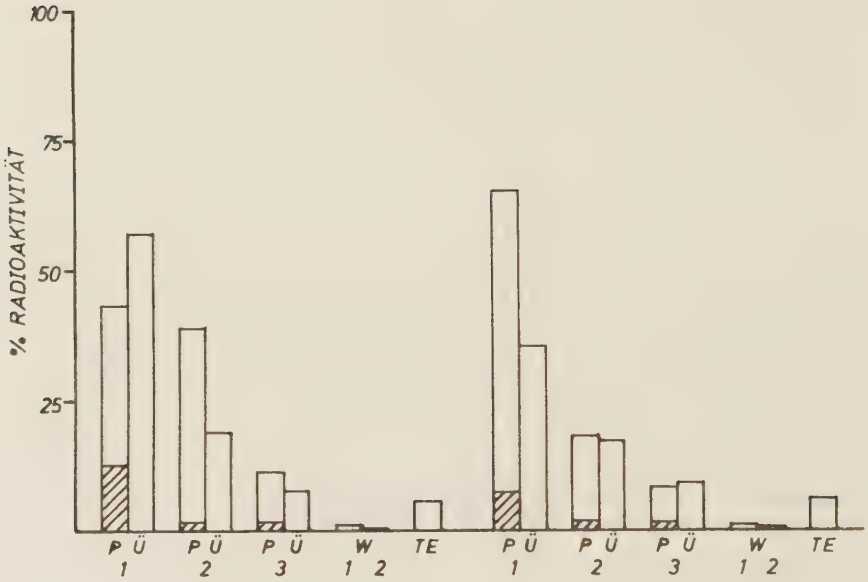


Abb. 14: Zellfraktionierung von Hepatocyten nach Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente. Die auf der Ordinate aufgetragene Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen ist bezogen auf die Summe aus Pellet 1 (P1) und Überstand 1 (Ü1) aus der Zentrifugation bei 1000 g. P2 und Ü2 erhält man nach Zentrifugation bei 20.000 g, im P3 sind die mikrosomalen Lebermembranen zu finden. Beim Waschen der Membranen fallen die Überstände W1 und W2 an, die Radioaktivität im Tritonextrakt aus den Lebermembranen ist mit TE bezeichnet. Die schraffierten Teile der Säulen geben den bei Extraktion nicht in Lösung gegangenen Anteil der Radioaktivität an. Zur Durchführung der Zellfraktionierung s. 3.9.

tion der mikrosomalen Membranen mit Plasmamembranen von etwa 10 % überein. Vergleicht man die markierten Insulinrezeptoren in den einzelnen Zellfraktionen durch SDS-PAGE, so kann kein Strukturunterschied festgestellt werden (vgl. 4.5.).

4.5. Struktur des photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptors in Hepatocyten

4.5.1. Gelfiltration des Rezeptors

Durch Extraktion des markierten Rezeptors aus den Hepatocyten mit Triton konnten 75-80 % der Radioaktivität in Lösung gebracht werden und die Rezeptorstruktur durch Gelfiltration untersucht werden. Abbildung 15 zeigt Elutionsprofile der Gelfiltration von Extrakt über Sepharose CL 6B, wobei ein spezifischer Hauptpeak (I) gefunden wurde. Ein weiterer kleiner Peak (II) war nur nach Extraktion ohne NEM im Extraktionspuffer deutlich zu finden. Dieser Peak stellt möglicherweise ein Abbauprodukt des Rezeptors dar (nicht näher untersucht). Durch Gelfiltration der Extrakte aus verschiedenen Zellfraktionen, die nach Photoaffinitätsmarkierung hergestellt wurden (vgl. 4.4.3.), wurden dieselben Elutionsprofile erhalten. Die Peaks, die nach der Position von ^{125}J-Insulin eluieren, stellen Insulinabbauprodukte dar. Die Abbaukapazität des Extraktes aus ganzen Zellen ist so groß, daß die eingesetzte NEM-Konzentration zu deren Inhibierung nicht ausreicht.

Auch mit Octylglucoseextrakten wurden dieselben Elutionsdiagramme erhalten (Abbildung 16). ohne NEM im Extraktionspuffer trat der zweite spezifische Peak (II) allerdings nur andeutungsweise auf. Im Gegensatz zu Tritonextrakten war der Insulinrezeptor in eingefrorenen Octylglucoseextrakten nicht stabil. Nach Wiederauftauen war über die Hälfte der

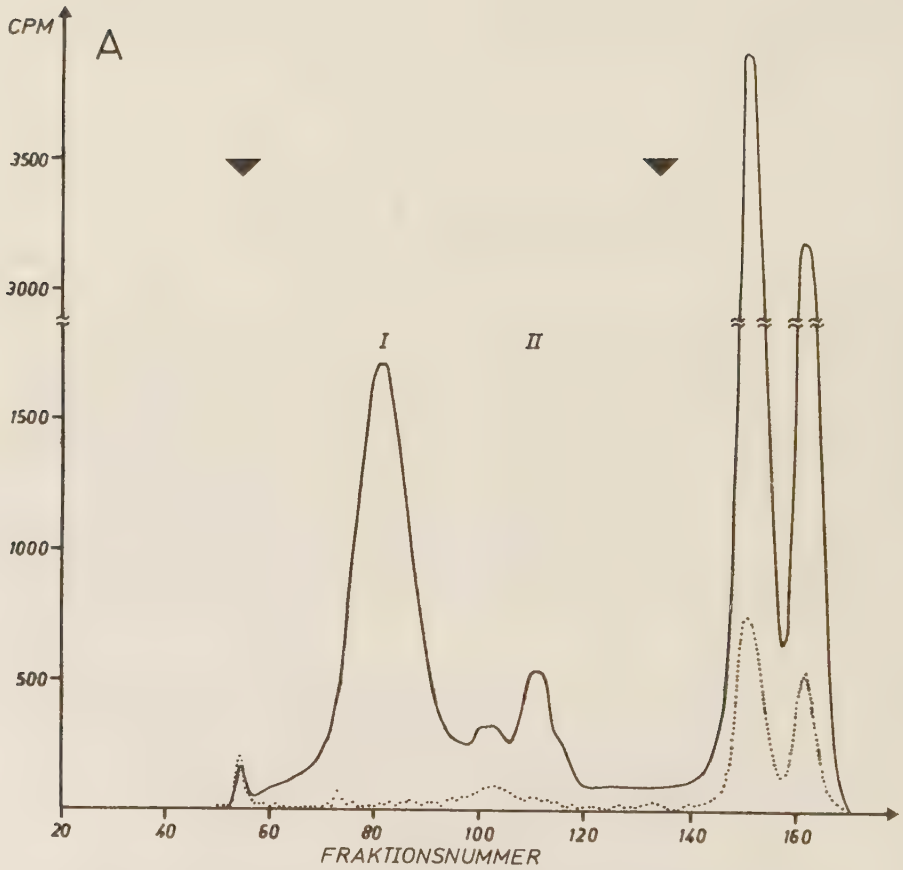
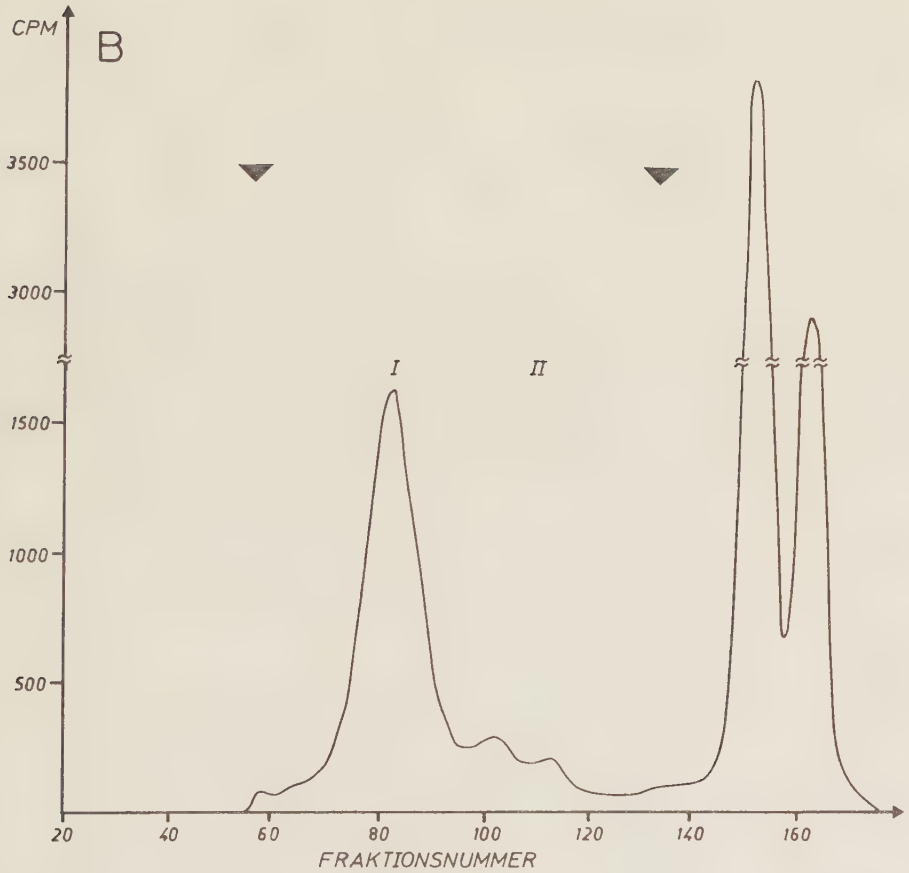


Abb. 15: Gelfiltration des photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptors über Sepharose CL 6B. Der Insulinrezeptor wurde in Hepatocyten markiert und nach Tritonextraktion mit Extraktionspuffer ohne NEM (A) bzw. mit 1,2 mM NEM (B) gelfiltriert. Das Ausschlußvolumen und das Elutionsvolumen von ^{125}J-Insulin sind durch Pfeile markiert. Die Linie gibt das Elutionsprofil wieder, wenn in Gegenwart von 30 µg/ml nativem Insulin markiert wurde (unspezifische Markierung).


CPM
B
3500
3000
1500
1000
500
I
II
20
40
60
80
100
120
140
160
FRAKTIONSNUMMER

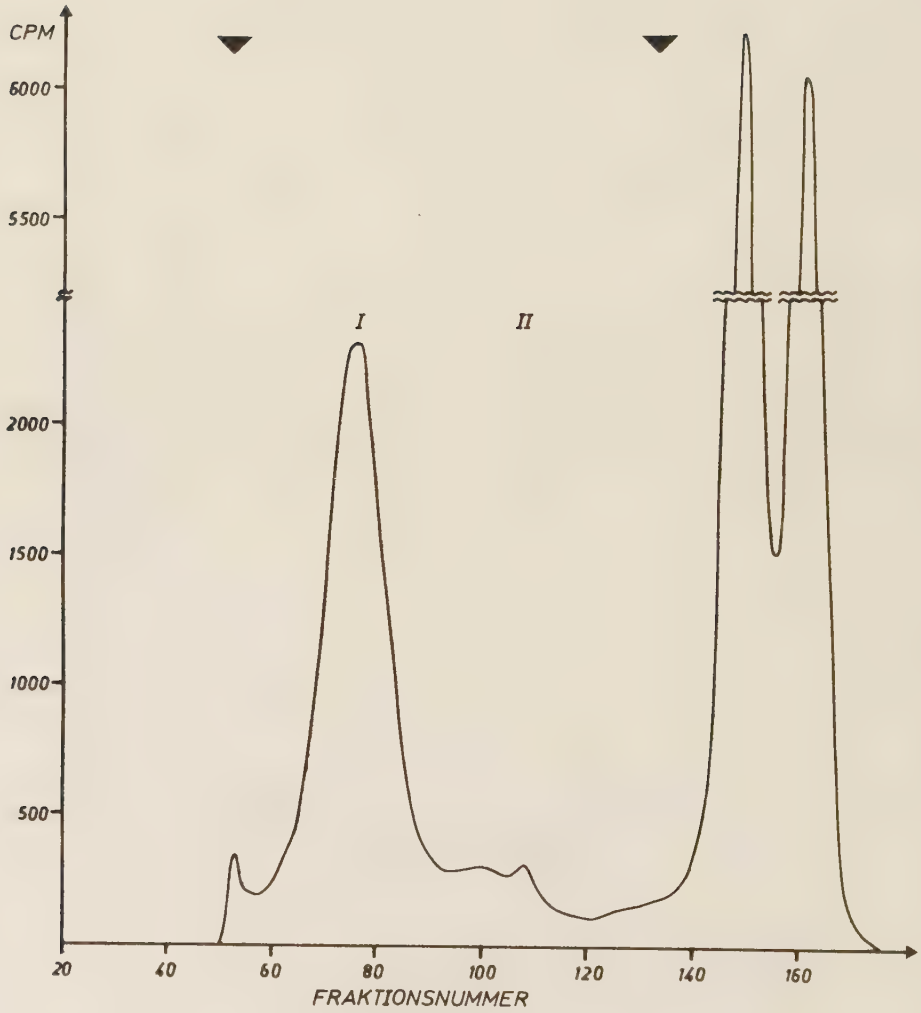


Abb. 16: Wie Abbildung 15, der Insulinrezeptor wurde jedoch mit Octylglucose extrahiert (ohne NEM oder Bacitracin im Extraktionspuffer).

Radioaktivität mit einem flockigen Niederschlag ausgefallen. Im Überstand konnte durch Gelfiltration und Elektrophorese kein Rezeptorprotein mehr, sondern nur noch niedermolekulare Radioaktivität (abdissoziiertes und abgebautes ^{125}J-MABI) nachgewiesen werden.

Da mit dem angewandten Verfahren nur die Rezeptoren der Plasmamembran markiert wurden, besteht die Möglichkeit, daß intrazelluläre Rezeptoren mit anderer Struktur übersehen wurden. Um dies zu überprüfen, wurde Tritonextrakt aus frisch isolierten Hepatocyten hergestellt (vgl. 3.10.1.) und dieser, der alle zellulären Rezeptoren enthalten muß, über Sepharose CL 4B analog zu Koch (191) gelfiltriert. Nach Testen der Bindung von ^{125}J-Insulin in den einzelnen Fraktionen konnte ebenfalls nur ein Peak gefunden werden. Dieser ist mit dem Peak I von Koch identisch, was durch Vergleich der Bindungseigenschaften (Bindung von ^{125}J-Insulin bei pH 7 in 0,01 M KNaPP oder bei pH 8 in 0,1 M KNaPP) und durch Photoaffinitätsmarkierung des Rezeptors in den einzelnen Fraktionen und nachfolgende elektrophoretische Charakterisierung nachgewiesen wurde.

4.5.2. SDS-PAGE des Rezeptors

Die SDS-PAGE zeigt nach Autoradiographie der getrockneten Gele, daß es sich beim Insulinrezeptor um ein kompliziertes Molekül handelt, welches durch SDS in mehrere elektrophoretische Banden aufspaltet. In Abbildung 17 sind für den nichtreduzierten Rezeptor fünf Banden zu erkennen, von denen die Banden 1 und 3 die Hauptbanden darstellen. Die schwächeren Banden 2, 4 und 5 konnten nicht immer mit der gleichen Intensität gefunden werden. Nach vollständiger Reduktion der Proben wurden immer zwei Banden gefunden (I und II). Partielle Reduktion mit 0,8 mM Mercaptoethanol führte zu einer Intensivierung der Bande 5 und Auftauchen der Banden 6 bis 8. Die Banden 9 und 10, die mit den Banden I und II

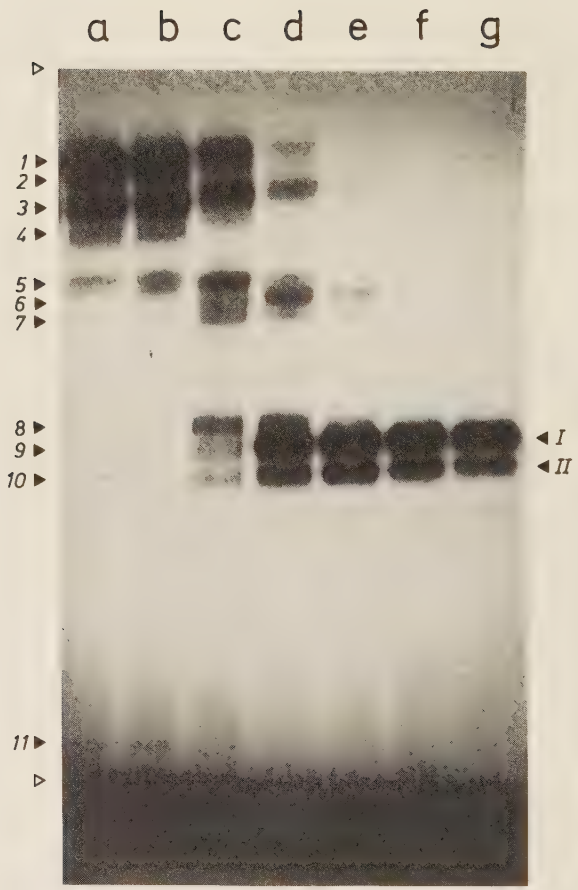


Abb. 17: SDS-PAGE des Insulinrezeptors in einem Laemmli-Gradientengel (4-10 % Acrylamid). Der Insulinrezeptor wurde nach Photoaffinitätsmarkierung mit Triton aus Hepatocyten extrahiert. Die offenen Dreiecke markieren den Anfang des Trenngels und die Bromphenolblaubande. Die Proben wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Mercaptoethanol reduziert:

a) ohne Reduktion
b) 0,42 mM
c) 0,84 mM
d) 2,1 mM
e) 4,2 mM
f) 8,4 mM
g) 42,0 mM

nach vollständiger Reduktion identisch sind, sind bereits zu erkennen, während die Banden 2 und 4 fast verschwunden sind. Bei Reduktion mit 2 mM Mercaptoethanol sind die Banden 2 und 4 verschwunden, 1 und 3 sind noch zu erkennen, während 9 und 10 bereits die Hauptbanden sind. Mit 4 mM Mercaptoethanol sind außer diesen Hauptbanden nur noch die Banden 3 und 6 zu erahnen, mit 8 mM Mercaptoethanol wird vollständige Reduktion zu den Banden I und II erreicht. Es ist zu beachten, daß die angegebenen Konzentrationen an Mercaptoethanol für die verschiedenen Reduktionsstufen von der Proteinkonzentration der verwendeten Probe abhängen.

Die in Abbildung 17 mit 11 bezeichnete schwache Bande (MG etwa 35.000) verschwindet bei Reduktion und ist vermutlich ein Rezeptorbruchstück. Die Molekulargewichte der übrigen Banden sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Bande	Molekulargewicht	
1 2 3 4 5	390.000 360.000 320.000 290.000 245.000	Ohne Reduktion
6 7 8	220.000 205.000 140.000	Nach partieller Reduktion
9 ≙ I 10 ≙ II	130.000 115.000	Nach vollständiger Reduktion
	150.000	Nach Trypsinspaltung

Tabelle 3: Molekulargewichte der photoaffinitätsmarkierten Rezeptorbanden.

Die oben beschriebenen Bandenmuster wurden unabhängig davon erhalten, ob die Elektrophoreseproben aus Tritonextrakt oder durch Lyse ganzer Zellen mit H_2O dest. gewonnen wurden (vgl. 3.16.). Die bei Tritonextraktion nicht in Lösung gegangene Radioaktivität stellt hauptsächlich aggregiertes Material dar, welches bei Elektrophorese auf dem Sammelgel liegen bleibt, ein kleiner Teil davon ist in den Rezeptorbanden zu finden. Die Abbildung 18 zeigt, daß in der SDS-PAGE nach Fairbanks nur die Banden 1 bis 5 aufzulösen sind. Die vollständige Reduktion tritt wegen der höheren Proteinkonzentration der Proben erst bei höheren Mercaptoethanolkonzentrationen als in Abbildung 17 ein. Alle in den Abbildungen 17 und 18 markierten Banden sind spezifische Rezeptorbanden, da sie verschwinden, wenn die Inkubation zur Photoaffinitätsmarkierung 30 µg/ml natives Insulin enthielt. Es konnte keine unspezifische Markierung von Proteinen beobachtet werden.

Wurde nach Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors eine Fraktionierung der Hepatocyten durchgeführt (vgl. 4.4.3.), so konnten bei Elektrophorese aller Fraktionen ohne Reduktion die Banden 1 bis 5 in wechselnden Intensitätsverhältnissen wie oben beschrieben erhalten werden.Nach Reduktion wurden ebenfalls die Banden I und II gefunden. Der Insulinrezeptor aus der Plasmamembran (nur dieser wird markiert) erfährt also durch die Präparation der mikrosomalen Membranfraktion keine strukturellen Veränderungen.

Da evtl. vorhandene intrazelluläre Rezeptoren mit anderer Struktur als der Plasmamembranrezeptor nicht markiert sind (vgl. 4.5.1.), wurde nach Photoaffinitätsmarkierung des Rezeptors in Hepatocyten tritonextrahiert (0,01 M KNaPP im Extraktionspuffer) und der Extrakt mit ^{125}J-MABI 24 Stunden bei 4°C entweder in 0,01 M KNaPP pH 7 oder 0,1 M KNaPP pH 8 inkubiert (Durchführung nach Koch (191, 194)). Nach Photolyse wurden die Proben zur Elektrophorese verwendet. Durch diese erneute Photoaffinitätsmarkierung sollte überprüft werden, ob andere Banden zu den bereits markierten hinzu-

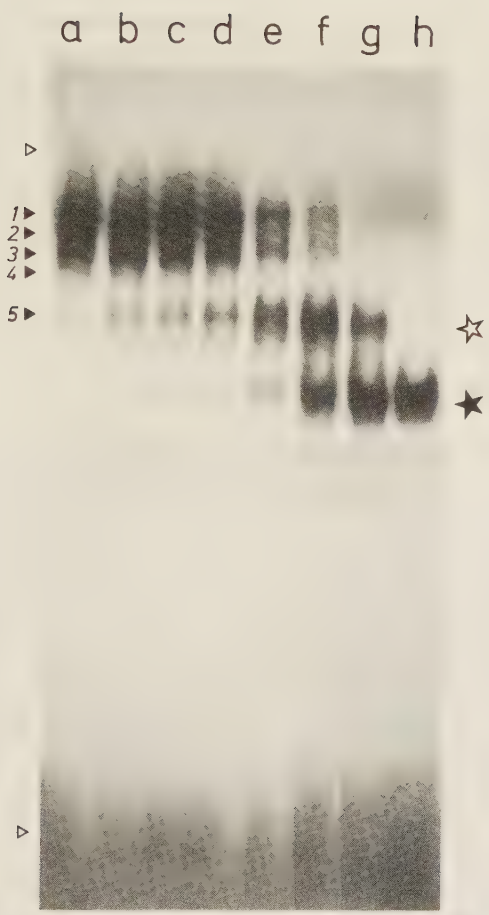


Abb. 18: SDS-PAGE des Insulinrezeptors in einem 4 %igen Fairbanksgel. Der Insulinrezeptor wurde nach Photoaffinitätsmarkierung mit Triton aus Hepatocyten extrahiert. Die offenen Dreiecke markieren die Startlinie und die Bromphenolblaubande. Der offene Stern markiert die in Abbildung 17 mit 5-7, der geschlossene Stern die mit 8-10 bezeichneten Banden, die in diesem Gel nicht aufgetrennt werden. Die Proben wurden mit folgenden Konzentrationen an Mercaptoethanol reduziert:

a) ohne Reduktion
b) 0,42 mM
c) 0,56 mM
d) 0,84 mM
e) 2,1 mM
f) 4,2 mM
g) 8,4 mM
h) 42,0 mM

kommen. Bei pH 7 (0,01 M KNaPP) wurde ein unverändertes Bandenmuster gefunden. Bei pH 8 (0,1 M KNaPP) wurden zwar keine neuen spezifischen Banden gefunden, die Intensität der Bande 5 nahm jedoch auf Kosten der Bande 1 stark zu. Es konnte gezeigt werden, daß diese Veränderung der Intensitätsverhältnisse alleine durch die Inkubation des Extraktes bei pH 8 in 0,1 M KNaPP, also auch ohne Photolyse, ausgelöst wurde.

4.6. Kovalente Insulin-Rezeptor-Bindung

Wie in den Dissoziationsexperimenten gezeigt wurde (vgl. 4.2.), kann bei Inkubation von ^{125}J-Insulin mit Hepatocyten ein Teil des gebundenen ^{125}J-Insulins nicht mehr dissoziiert werden, was durch Entstehen einer kovalenten Bindung zum Rezeptor erklärt werden könnte (vgl. 1.2.). Wenn eine solche kovalente Insulin-Rezeptor-Bindung in Hepatocyten zustande kommt, dann sollte der entstandene Komplex durch Elektrophorese und Autoradiographie der getrockneten Gele nachweisbar sein. Daher wurden Hepatocyten bei 37°C mit ^{125}J-Insulin inkubiert und nach 15 Minuten Assoziation in ^{125}J-insulinfreies Medium dissoziiert. Sowohl am Ende der Assoziationsphase als auch während der Dissoziation (nach 10, 20 und 40 Minuten) wurden Aliquots entnommen, zentrifugiert und nach Lyse der Zellen im Pellet mit H_2O dest. weiter zur Elektrophorese zubereitet. In keiner der untersuchten Proben konnte hochmolekulare Radioaktivität in irgendeiner Form gefunden werden. Auch nach Inkubation bis zu einer Stunde bei 16 oder 23°C konnten keine Rezeptorbanden nachgewiesen werden.

In einer anderen Versuchsreihe (in Anlehnung an die Experimente von Saviolakis et al. (285)) wurden Hepatocyten nach Inkubation mit ^{125}J-Insulin bei 23 oder 37°C (mit oder ohne Bacitracin) nach 10, 20 oder 60 Minuten abzentrifugiert und tritonextrahiert. Im Unterschied zum üblichen Verfahren

wurden die Extrakte unverdünnt zentrifugiert (30 Minuten bei 12.000 rpm, SS 34) und die Überstände zur Gelfiltration über Sephadex G50 fine (Säule 1,2 x 100 cm, Elution in 1 M Essigsäure/0,1 % Tri) verwendet. Die im Ausschlußvolumen eluierte Radioaktivität wurde fraktionsweise dialysiert und im Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Die erhaltenen Rückstände wurden zu gleichen Teilen in H_2O dest. und Probenpuffer aufgenommen und zur Elektrophorese verwendet. Auch mit diesem Verfahren konnten auf den Autoradiographien der getrockneten Gele (Belichtung bis zu 55 Tagen bei -30°C!) keine Rezeptorbanden dargestellt werden.

4.7. Internalisierung von ^{125}J-Insulin

Nach dem Ergebnis des vorangegangenen Abschnitts bleibt zur Erklärung der unvollständigen Dissoziation von zellgebundenem ^{125}J-Insulin die Internalisierung des Hormons. Die ersten Versuche zur Internalisierung hatten zum Ziel, diese zu inhibieren, da bei Photoaffinitätsmarkierung ausschließlich die Insulinrezeptoren der Plasmamembran markiert werden sollten. Außerdem kann aus dem Angriffsort eines wirksamen Inhibitors auf den Internalisierungsmechanismus geschlossen werden. Aus der Literatur waren eine Reihe von Substanzen bekannt, die endocytotische Vorgänge durch verschiedene inhibitorische Effekte stören sollen. Eine Übersicht über die untersuchten Inhibitoren gibt die Tabelle 4. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen etwa den aus der Literatur entnommenen wirksamen Mengen. Die Inhibierung der Internalisierung muß zur Folge haben, daß ^{125}J-Insulin nur noch reversibel an den Rezeptor auf der Zelloberfläche binden kann. Durch Assoziation und anschließende Dissoziation läßt sich also die Wirksamkeit eines Inhibitors überprüfen.

INHIBITOR	WIRKUNG AUF	GETESTETE KONZENTRATION	LITERATUR
Colchicin	Mikrotubuli	1 und 10 mM	24, 246
Vinblastin	Mikrotubuli	120 µM	49, 246
Cytochalasin B	Mikrofilamente	4 µM	25, 27, 331
Dansylcadaverin	Transglutaminase	150 µM	130, 209, 316
Bacitracin	Transglutaminase	550 µM	131
Phenylglyoxal	Arginin	1,2 mM	131, 306, 307

Tabelle 4: Potentielle Internalisierungsinhibitoren

4.7.1. Inhibitoren der Internalisierung

Die Hepatocyten wurden mit allen Agenzien, die auf ihren Effekt auf die Internalisierung getestet wurden, 15-30 Minuten bei Raumtemperatur vorinkubiert, ehe die Assoziation von ^{125}J-Insulin gestartet wurde (vgl. 3.11.3.). Dadurch sollte sichergestellt werden, daß keine Internalisierung stattfindet, bevor der potentielle Inhibitor seine Wirkung entfalten kann.

4.7.1.1. Transglutaminaseinhibitoren

Von einigen Autoren wurde eine Inhibierung des Rezeptorclustering und der Internalisierung verschiedener Liganden beobachtet (vgl. 1.2.). Daher wurden Bacitracin und Dansylcadaverin, zwei potente Transglutaminaseinhibitoren, auf ihre Wirksamkeit auf die Internalisierung von ^{125}J-Insulin in Hepatocyten untersucht.

Bereits in Abschnitt 4.2. wurde gezeigt, daß mit Bacitracin im Inkubationsmedium der nicht dissoziierbare Anteil an ^{125}J-Insulin während der Inkubation zunimmt (vgl. Abbildung 8). Eine Beteiligung von Transglutaminasen an der Internalisierung von Insulin durch Hepatocyten ist damit auszuschließen. Einige Versuche mit Dansylcadaverin konnten dies bestätigen.

Da Bacitracin die Internalisierung nicht beeinflußt, wurden die Effekte der anderen potentiellen Inhibitoren in Gegenwart von Bacitracin untersucht, da der Insulinabbau die Interpretation der Ergebnisse ohne Bacitracin erschwert.

4.7.1.2. Phenylglyoxal, ein Argininreagens

Phenylglyoxal, das relativ spezifisch mit Arginin reagiert (306, 307), wurde als Inhibitor der Internalisierung von α_2-Makroglobulin in Makrophagen (169) und von EGF (epidermal growth factor) in kultivierten Rattennierenzellen (131) beschrieben. Auch mit dieser Substanz konnte die Insulininternalisierung in Hepatocyten nicht inhibiert werden.

4.7.1.3. Zerstörung von Mikrofilamenten und Mikrotubuli

Da eine Beteiligung des Cytoskeletts an endocytotischen Vorgängen von verschiedenen Autoren diskutiert wird (26, 195, 271, 311, 326), wurden Cytochalasin B, Colchicin und Vinblastin auf ihre inhibitorische Wirkung getestet.

Cytochalasin B stört die Funktion der Mikrofilamente durch Bindung an die Enden der Actinfilamente (25, 27, 331). Ein Einfluß auf das Dissoziationsverhalten von ^{125}J-Insulin war nicht zu beobachten (Abbildung 19).

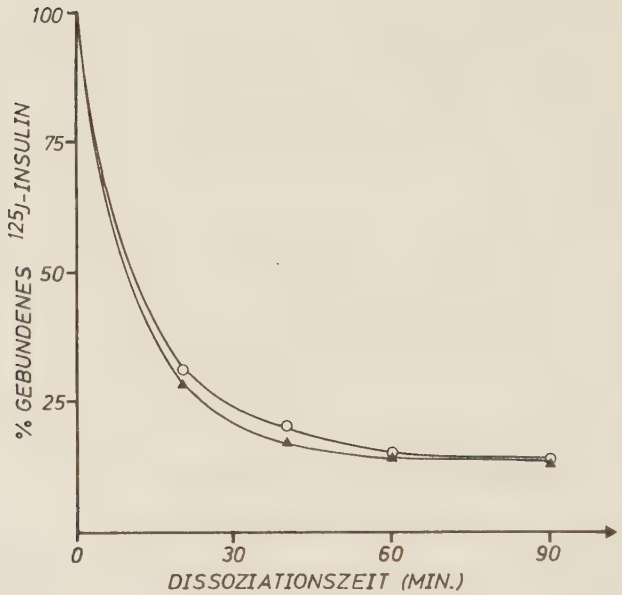


Abb. 19: Dissoziation von zellgebundenem ^{125}J-Insulin bei 37°C nach 30 Minuten Assoziation bei 37°C (vgl. 3.11.3.). Assoziation und Dissoziation wurden entweder ohne (○) oder in Gegenwart von 4 µM Cytochalasin B (▲) durchgeführt. Das ^{125}J-insulinfreie Dissoziationsmedium enthielt 100 nM natives Insulin.

Colchicin, welches sowohl die Tubulinpolymerisation verhindert als auch Mikrotubuli depolymerisiert (24, 246), hat dagegen einen Effekt auf die Dissoziation, jedoch nicht im Sinne einer inhibierten Internalisierung. In Abbildung 20 ist gezeigt, daß die Akkumulation von nicht dissoziierbarem ^{125}J-Insulin durch Colchicin verstärkt wird. Dieses Ergebnis erscheint zuerst paradox, es läßt sich aber zusammen mit den Ergebnissen im nächsten Abschnitt erklären (vgl. 4.8.2. und 5.4.2.).

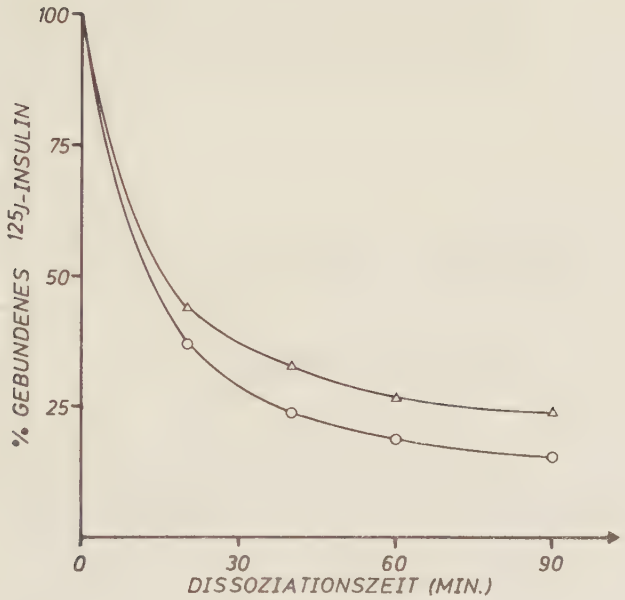


Abb. 20: Wie Abbildung 19, Assoziation und Dissoziation wurden in Gegenwart von 1 mM Colchicin (▵) oder in einer Kontrolle ohne Colchicin (○) durchgeführt. Die Kurven stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten dar.

Mit Vinblastin, welches zu unkontrollierter Tubulinpolymerisation führt und dadurch die Funktion der Mikrotubuli ebenfalls inhibiert (49, 246), wurde ein analoges Ergebnis erzielt. Wegen der Vielzahl anderer Vinblastineffekte (49, 128) wurde für die weiteren Untersuchungen nur Colchicin verwendet.

Da bei der Bewegung von Insulinrezeptoren in der Ebene der Plasmamembran als einer Voraussetzung zur Internalisierung (vgl. 1.2.) möglicherweise Mikrotubuli und Mikrofilamente eine gemeinsame Rolle spielen (70), wurde auch der gleichzeitige Einsatz von Colchicin und Cytochalasin B getestet.

Es wurde dasselbe Ergebnis erhalten wie mit Colchicin allein. Cytochalasin B beeinflußt also weder das Dissoziationsverhalten von ^{125}J-Insulin noch den oben beschriebenen Colchicineffekt.

4.7.1.4. Effekte der getesteten Substanzen auf Bindung und Abbau von ^{125}J-Insulin

Der Einfluß von Bacitracin auf die Bindung und den Abbau von ^{125}J-Insulin wurde bereits in den Abschnitten 4.1.2. und 4.3. gezeigt.

Die Abbildung 21 zeigt Assoziationskurven von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten in Gegenwart von Colchicin bzw. Cytochalasin B zusätzlich zu Bacitracin bei 23°C. Cytochalasin B hatte keinen Einfluß auf die spezifische Bindung, während Colchicin (10 mM) eine Abnahme um etwa 30 % verursachte. Diese Inhibierung der Bindung wurde mit steigender Temperatur größer, bei 30°C war die Abnahme etwa 45 % (Abbildung 22). In einer Konzentration von 1 mM hatte Colchicin keinen Effekt mehr auf die Bindung.

Phenylglyoxyal und Dansylcadaverin führten bei 23°C zu einer Abnahme der spezifischen Bindung um etwa 10 % (nicht gezeigt).

Der Insulinabbau wurde nur von Colchicin beeinflußt, alle anderen Agenzien hatten keinen Effekt (Vinblastin wurde nicht untersucht). Mit 1 mM Colchicin war ein leicht, mit 10 mM ein deutlich verlangsamter Insulinabbau zu beobachten. In Abbildung 23 ist die Zunahme der TCA-löslichen Radioaktivität während Inkubation bei 23°C mit Colchicin und Cytochalasin B gezeigt. Die Abbaukapazität im Zellüberstand (vgl. 4.3.) wurde von Colchicin in gleicher Weise beeinflußt (Abbildung 24).

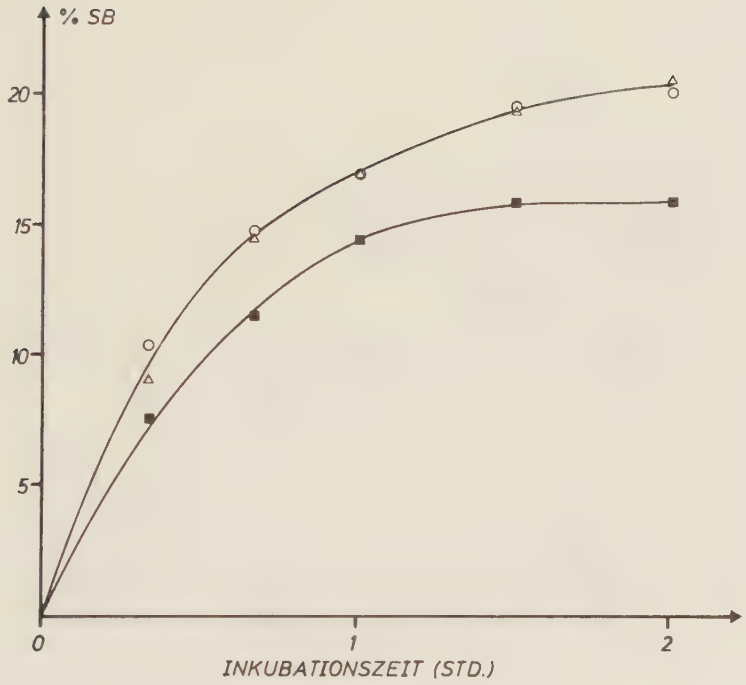


Abb. 21: Assoziation von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten bei 23°C. Die Kurven zeigen die Assoziation in Gegenwart von 4 µM Cytochalasin B (△), 10 mM Colchicin (■) und die Kontrollassoziation (○).

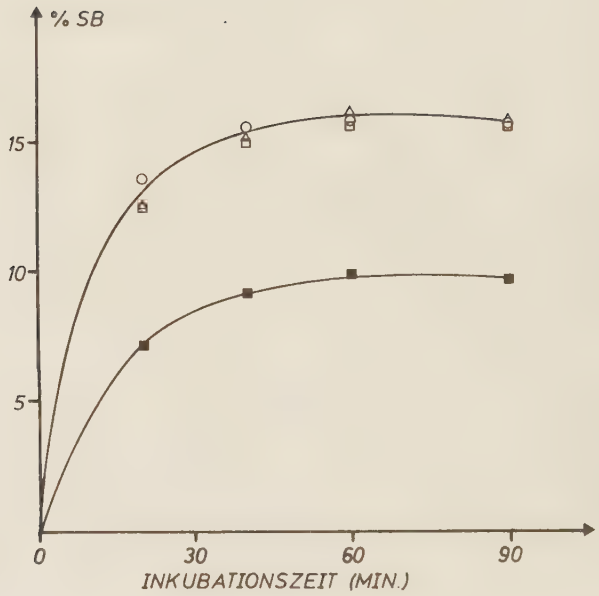


Abb. 22: Assoziation von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten bei 30°C. Die Kurven zeigen die Assoziation in Gegenwart von 4 µM Cytochalasin B (△), 1 mM Colchicin (□), 10 mM Colchicin (■) und die Kontrollassoziation (○).

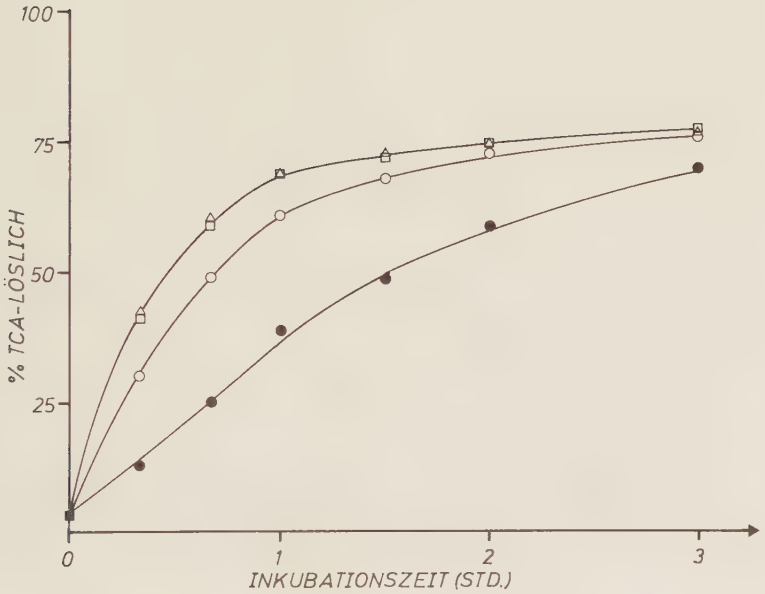


Abb. 23: Insulinabbau einer Hepatocytensuspension bei 23°C (kein Bacitracin im Inkubationsmedium). Dargestellt ist der Effekt von 4 µM Cytochalasin B (△), 1 mM Colchicin (○) und 10 mM Colchicin (●) im Vergleich zur Kontrolle ohne Agenzien (□).

Abb. 24: Extrazellulärer Insulinabbau von Hepatocytensuspensionen. Nach einstündiger Inkubation bei 23°C ohne ^{125}J-Insulin wurden die Hepatocyten abzentrifugiert und der Zellüberstand bei 23°C mit ^{125}J-Insulin inkubiert (□). Entsprechend wurden Zellüberstände mit ^{125}J-Insulin und 1 mM (○) bzw. 10 mM (●) Colchicin inkubiert. Alle Inkubationen wurden ohne Bacitracin durchgeführt.

Um Effekte auf die Bindung ohne eventuelle Einflüsse durch gestörte zelluläre Funktionen beobachten zu können, wurden CON A-Eluate aus Tritonextrakten mirkosomaler Lebermembranen mit entsprechenden Konzentrationen der Inhibitoren und ^{125}J-Insulin inkubiert (vgl. 3.11.1.). Die Abbildung 25 A zeigt die spezifischen Bindungen im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze. Die einzelnen Agenzien inhibierten die Bindung mit Ausnahme von Phenylglyoxal (s.u.) zwischen 7 und 15 %. Kombination von Colchicin und Cytochalasin B brachte keine weitere Inhibierung, zusätzlicher Einsatz von Bacitracin senkte die Bindung jedoch noch weiter. Die leichte Inhibition der Bindung durch Bacitracin konnte bei Hepatocyten nicht beobachtet werden, da der Anstieg der Bindung durch Inhibition des Insulinabbaus weitaus größer ist.

Obwohl Phenylglyoxal in Hepatocytensuspensionen nur einen geringen Einfluß auf die Insulinbindung hatte, so war der Effekt im CON A-Eluat dramatisch. Die unspezifische Bindung stieg auf das über siebenfache der Kontrolle an (Abbildungen 25 B, 26), die spezifische Bindung erreichte nur etwa 20 % der Kontrolle ohne Phenylglyoxal (Abbildung 25 A). Ebenso widersprüchlich war die Beeinflussung des Insulinabbaus. Während in der Zellsuspension keine Inhibition zu messen war, wurde eine scheinbare Hemmung in Tritonextrakt gefunden (Abbildung 26).

Die von der Phenylglyoxalkonzentration abhängige Zunahme der unspezifischen Bindung (Abbildung 26), die nach eigener Beobachtung außerdem bevorzugt im schwach Alkalischen auftritt, legt nahe, daß sich eine einfache chemische Reaktion hinter dem Effekt verbirgt. Da Phenylglyoxal ein bifunktionelles Reagens ist, vermag es Proteine unter bestimmten Bedingungen zu vernetzen (306). Durch Inkubation von ^{125}J-Insulin mit Phenylglyoxal (ohne gelösten Rezeptor) wurden 7-15 % der Radioaktivität PEG-fällbar, während in der Kontrolle ohne Phenylglyoxal nur 1 - 1,5 % fällbar waren. Gelfiltration an Sephadex G50 fine zeigte, daß der größte Teil der Radioaktivität nicht mehr im Insulinpeak, sondern

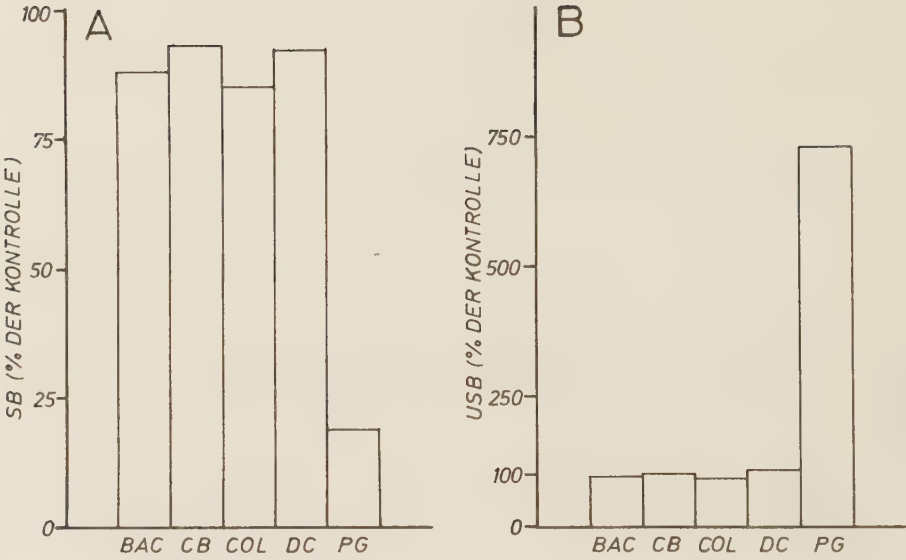


Abb. 25: Vergleich der spezifischen (A) bzw. der unspezifischen (B) Bindungen von ^{125}J-Insulin in CON A-Eluaten aus Tritonextrakten mikrosomaler Lebermembranen in Gegenwart verschiedener Agenzien (vgl. 3.11.1.):

BAC	550	µM Bacitracin (0,8 mg/ml)
CB	4	µM Cytochalasin B
COL	10	mM Colchicin
DC	150	µM Dansylcadaverin
PG	1,2	mM Phenylglyoxal

im Ausschlußvolumen eluierte, d.h. Phenylglyoxal hat tatsächlich zu einer Proteinaggregation geführt. Die Inhibition des Insulinabbaus rührte also daher, daß die entstandenen Aggregate nicht mehr für Abbauenzyme angreifbar waren, das Ansteigen der unspezifischen Bindung folgte aus deren PEG-Fällbarkeit.

Die Vernetzungsreaktionen blieben bei den Versuchen mit Hepatocyten ohne sichtbare Folgen, da die Zellen mit Phenyl-

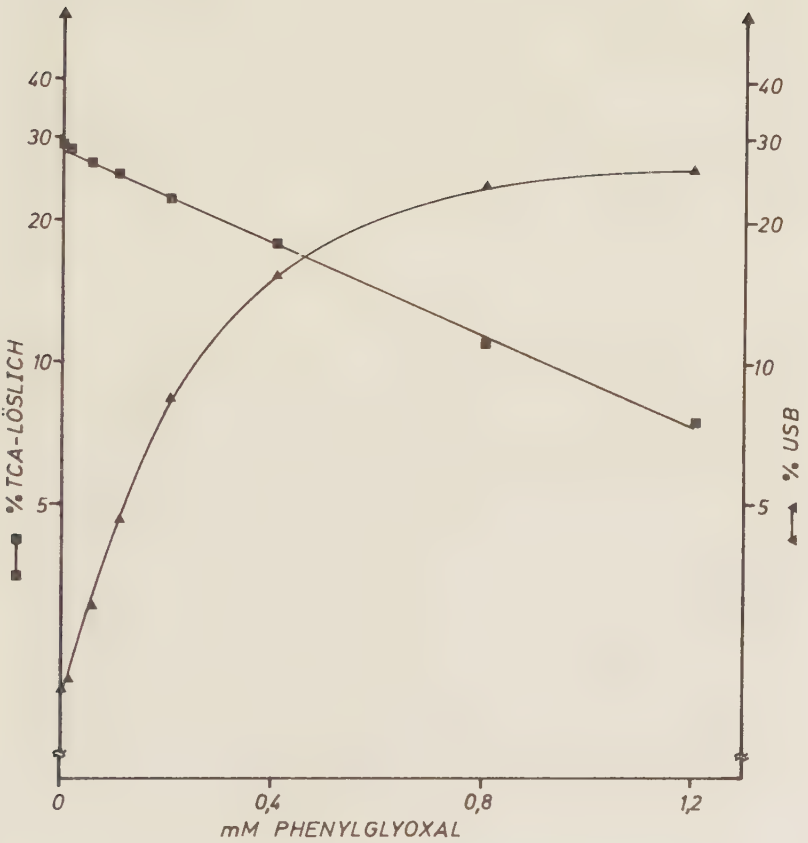


Abb. 26: Abhängigkeit von Insulinabbau und unspezifischer Bindung von der Phenylglyoxalkonzentration. Zur Bestimmung des Insulinabbaus (■) wurde ^{125}J-Insulin eine Stunde bei 30°C mit Tritonextrakt aus mikrosomalen Lebermembranen (vgl. 3.7.1.) inkubiert. Anschließend wurde TCA-gefällt. Die unspezifische Bindung von ^{125}J-Insulin (▲) wurde in CON A-Eluaten, die aus Tritonextrakten der mikrosomalen Lebermembranen gewonnen wurden (vgl. 3.7.2.), nach 20 Stunden Inkubation bei 4°C (vgl. 3.11.1.) bestimmt.

glyoxal vorinkubiert wurden und dieses während der Vorinkubation mit Zellproteinen reagieren konnte. Wenn dann die Inkubation mit ^{125}J-Insulin gestartet wurde, war keine Aggregatbildung mit ^{125}J-Insulin mehr möglich.

Aufgrund dieser Beobachtungen erscheint es fragwürdig, Phenylglyoxal als Internalisierungsinhibitor zu verwenden, und die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse (131, 169) sind mit Skepsis zu betrachten.

4.7.2. Temperaturabhängigkeit

Die in Abschnitt 4.2. dargestellten Dissoziationsversuche zeigen, daß bei höheren Temperaturen der nicht dissoziierbare Anteil an zellgebundenem ^{125}J-Insulin mit der Zeit größer wurde, bei 16°C jedoch unverändert blieb (Abbildungen 8 und 9). Bei dieser Temperatur ist also keine Internalisierung von Insulin zu beobachten. Dieses Verhalten ist charakteristisch für die adsorptive Pinocytose oder rezeptorvermittelte Endocytose, die unterhalb von etwa 18°C nicht mehr ablaufen kann (231). Um die Internalisierung für bestimmte Fragestellungen, z.B. die Photoaffinitätsmarkierung der Insulinrezeptoren ausschließlich der Plasmamembran, zu inhibieren, wurden die Hepatocyten bei 16°C inkubiert.

4.8. Intrazelluläre Rezeptoren

Als intrazellulär werden diejenigen Rezeptoren angesehen, die einer Verdauung durch Trypsin nicht zugänglich sind. Abbildung 27 zeigt Assoziationskurven nach zehnminütiger Trypsinbehandlung der Hepatocyten, wobei zu sehen ist, daß nach Verdauung mit 200 µg/ml Trypsin nur noch 8 % der spezifischen Bindung im Vergleich zur Kontrollassoziation zu

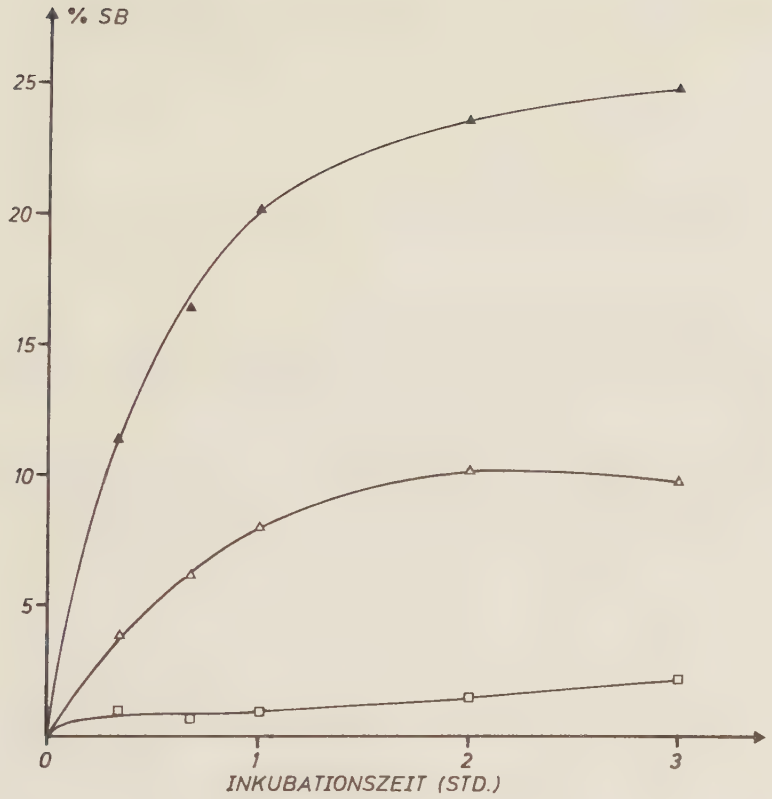


Abb. 27: Assoziation von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten nach Trypsinverdauung. Die Hepatocyten wurden 10 Minuten bei 37°C entweder mit 20 µg/ml (△) oder mit 200 µg/ml (□) Trypsin verdaut, anschließend wurden sie bei 23°C mit ^{125}J-Insulin inkubiert. Die SB nach Verdauung mit 200 µg/ml Trypsin beträgt noch 8 % der Kontrolle (▲).

messen war. Daraus folgt, daß über 90 % der Rezeptoren auf der Zelloberfläche zerstört worden sind. Wahrscheinlich wird jedoch der zerstörte Anteil unterschätzt, da ein Teil der Bindung an die verdauten Zellen durch Recycling von intrazellulären Rezeptoren zur Plasmamembran während der dreistündigen Assoziationsphase möglich wird (vgl. 5.4.). Wurde der photoaffinitätsmarkierte Insulinrezeptor trypsinverdaut, so verschwand außerdem das in der Kontrolle ohne Verdauung durch Elektrophorese und Autoradiographie erhaltene typische Bandenmuster vollständig und nur noch eine neue Bande war zu sehen (vgl. Abbildung 33 A).

Extrahiert man die Rezeptoren mit Triton direkt aus den Hepatocyten und schließt eine CON A-Fällung an, so kann die im CON A-Eluat gemessene spezifische Bindung von ^{125}J-Insulin als Maß für die gesamte Rezeptormenge der Hepatocyten dienen. Dabei wird davon ausgegangen, daß ein repräsentativer Teil der Rezeptoren extrahiert worden ist. Nach den Ergebnissen mit photoaffinitätsmarkierten Rezeptoren (vgl. 4.5.) können zwar nur 75-80 % der Radioaktivität in Lösung gebracht werden, beim Rest handelt es sich jedoch in erster Linie um aggregiertes radioaktives Material und nicht um Rezeptorprotein. Wird vor der Extraktion trypsinverdaut, so kann die im CON A-Eluat gemessene spezifische Bindung, sofern sie größer als 5-10 % der nichtverdauten Kontrolle ist, nur Bindung an intrazelluläre Rezeptoren darstellen. Die gesamte extrahierbare Rezeptormenge wird im folgenden als Gesamtrezeptorpool (GRP), der durch Trypsin nicht zerstörte Anteil als intrazellulärer Rezeptorpool (IRP) bezeichnet. In frisch isolierten Hepatocyten wurden etwa 15-20 % der Rezeptoren im IRP gefunden.Dieser Anteil änderte sich während zweistündiger Inkubation bei 37°C kaum (vgl. Kurve ohne Zusätze in Abbildung 28).

Zwischen GRP und IRP konnten keine Unterschiede im Bindungsverhalten von Insulin festgestellt werden. Die Dissoziationskonstanten lassen vermuten, daß im Zellinnern dieselbe Rezeptorspezies vorliegt wie in der Plasmamembran (vgl. Ta-

belle 5 und Abbildung 32, Vorinkubation ohne Zusätze). Dies steht im Einklang mit dem Nachweis, daß Membranrezeptoren durch Internalisierung ins Zellinnere gelangen (vgl. 4.9.).

4.8.1. Effekt von Insulin auf die zelluläre Rezeptorverteilung

Da bei der adsorptiven Pinocytose Insulin samt seinem Rezeptor internalisiert werden muß, wurde untersucht, welche Effekte Insulin auf die Rezeptorverteilung in Hepatocyten hat.

Bei Inkubation in Gegenwart von 10 nM Insulin war ein schneller Anstieg des intrazellulären Rezeptoranteils auf 30-35 % zu beobachten. An dieser neuen Verteilung änderte sich während Inkubation bis zu 2 Stunden nichts mehr (Abbildung 28). Nach Entfernen von Insulin aus dem Inkubationsmedium sank der intrazelluläre Rezeptoranteil wieder auf den ursprünglichen Wert (Abbildung 29). Der Tabelle 5 ist zu entnehmen, daß Insulin keinen Einfluß auf die Dissoziationskonstante des Insulin-Rezeptor-Komplexes hat.

Zur Bestimmung des IRP wurde parallel immer der GRP bestimmt, um den jeweils intrazellulären Anteil auf diesen beziehen zu können. Bei Vorinkubation mit Insulin besteht dabei die Möglichkeit, dieses in die hergestellten CON A-Eluate zu verschleppen, was die Meßergebnisse beeinflussen würde. Im RIA konnte jedoch in den CON A-Eluaten nach Hitzedenaturierung des Rezeptors (15 Minuten bei 60°C) kein Insulin nachgewiesen werden.

Vorinkubation		K_D (nM)	Nummer des Experiments
Minuten	in Gegenwart von		
50	ohne Bacitracin	0,55	1
50	-	0,70	1
60	-	0,64	2
60	-	0,62	3
50	4 µM Cytochalasin B	0,75	1
60	100 nM Insulin	0,56	2
60	100 nM Insulin und 10 mM Colchicin	0,47	3
60	100 nM Insulin und 10 mM Colchicin	0,64 (IRP)	3
60	-	0,60 (IRP)	3

Tabelle 5: Dissoziationskonstanten aus Verdrängungsexperimenten mit CON A-Eluaten aus Hepatocyten. Die Hepatocyten wurden nach Vorinkubation bei 37°C mit den angegebenen Agenzien (alle Inkubationsmedien enthielten Bacitracin außer dem entsprechend bezeichneten Ansatz) tritonextrahiert und der Extrakt CON A-gefällt. Für die Bestimmung der K_D-Werte der intrazellulären Rezeptoren wurden die Hepatocyten im Anschluß an die Vorinkubation trypsinverdaut. Die letzte Spalte zeigt, welche Daten aus unabhängigen Zellpräparationen gewonnen wurden. In dieser Zusammenstellung werden nur die Dissoziationskonstanten für die höheraffine Bindungsstelle berücksichtigt (vgl. 4.1.3.).

4.8.2. Effekt von Colchicin auf die zelluläre Rezeptorverteilung

Die Inkubation von Hepatocyten bei 37°C in Gegenwart von 1 mM Colchicin führte zu einer kontinuierlichen Akkumulation von Rezeptoren im Zellinnern. Im Verlauf von 2 Stunden wurde der IRP etwa verdoppelt (Abbildung 28). Abbildung 30 zeigt, daß Colchicin bis zu einer Konzentration von 1 mM

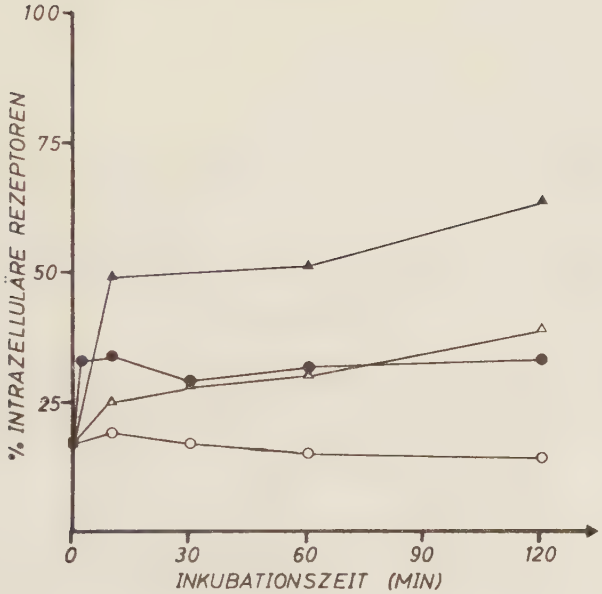


Abb. 28: Effekt von Insulin und Colchicin auf den intrazellulären Anteil an Insulinrezeptoren. Die Hepatocyten wurden bei 37°C ohne Zusätze (○), mit 10 nM Insulin (●), 1 mM Colchicin (△) oder 10 nM Insulin und 1 mM Colchicin (▲) inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Rezeptoren auf der Zelloberfläche durch Trypsinverdauung zerstört. Nach Tritonextraktion der Rezeptoren wurde CON A-gefällt und die Bindung von ^{125}J-Insulin in den CON A-Eluaten bestimmt. Durch Vergleich mit Kontrollansätzen ohne Verdauung konnte so der intrazelluläre Rezeptoranteil bestimmt werden. Die Meßpunkte geben Mittelwerte aus zwei bis fünf unabhängigen Versuchen wieder.

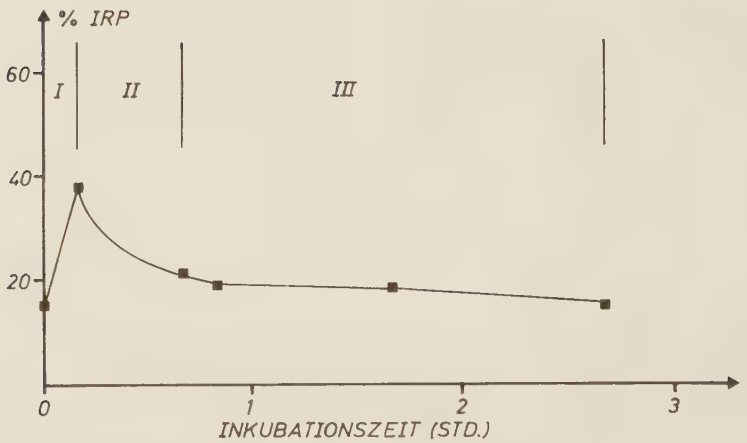


Abb. 29: Effekt von Insulin auf den intrazellulären Rezeptoranteil. Hepatocyten wurden 10 Minuten in Gegenwart von 10 nM Insulin inkubiert (I). In der Phase II wurden die Hepatocyten 30 Minuten in Inkubationsmedium ohne Insulin und ohne Bacitracin weiterinkubiert. In dieser Phase dissoziiert rezeptorgebundenes Insulin ab und wird abgebaut. Nach dieser Dissoziations- und Abbauphase wurde der intrazelluläre Rezeptoranteil noch über zwei Stunden weiterverfolgt (III). Die gesamte Inkubationsfolge wurde bei 37°C durchgeführt.

den GRP der Hepatocyten kaum beeinflußte. Dagegen nahm der IRP bei einstündiger Inkubation mit 0,5 µM Colchicin um etwa 30 % zu, zwischen 10 µM und 1 mM war eine Zunahme von 50-60 % zu beobachten. Bei 16°C war der Colchicineffekt auf die Größe des IRP deutlich kleiner.

Wurde Colchicin (1 mM) gleichzeitig mit 10 nM Insulin zur Inkubation eingesetzt, erfolgte ein schneller Anstieg des IRP auf 45-50 %, danach ein weiterer langsamer Anstieg auf 60-70 % des GRP (Abbildung 28).

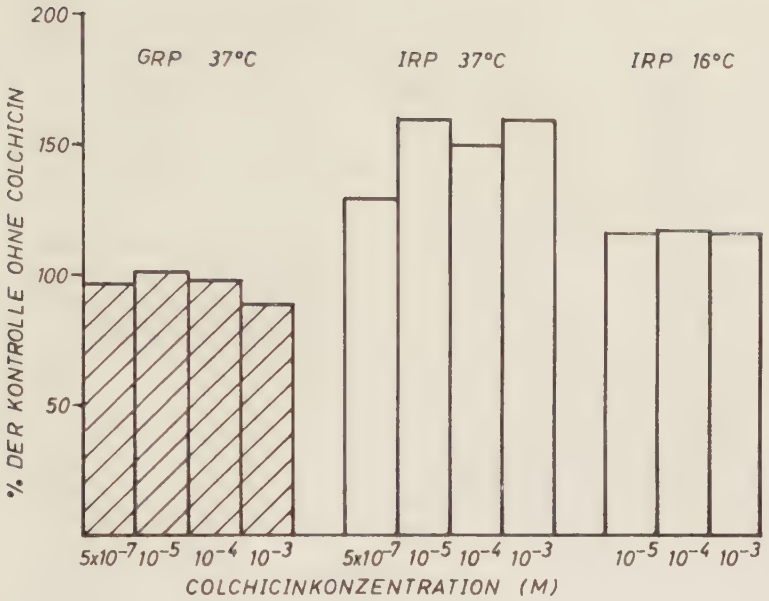


Abb. 30: Konzentrationsabhängigkeit der Colchicinwirkung auf die Rezeptorverteilung in Hepatocyten. Die Größe von GRP bzw. IRP wurde jeweils nach einstündiger Inkubation der Zellen bei 16 oder 37°C mit den angegebenen Colchicinkonzentrationen bestimmt. Die gemessenen Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle ohne Colchicin bezogen. Jede Säule stellt den Mittelwert aus zwei bis fünf unabhängigen Experimenten dar.

Die zur Inhibition der Internalisierung von Insulin getestete Konzentration von 10 mM Colchicin wurde ebenfalls bezüglich der Wirkung auf die Rezeptorverteilung untersucht. In Abbildung 31 ist gezeigt, daß der GRP bei 37°C auf etwa 50 % des Kontrollwertes schrumpfte, etwa 60 % der Rezeptoren wurden im Zellinnern gefunden. Bei 16°C dagegen blieb dieser drastische Effekt aus. Das bedeutet, daß die in 4.7.1.4. gezeigte Abnahme der spezifischen Bindung von ^{125}J-

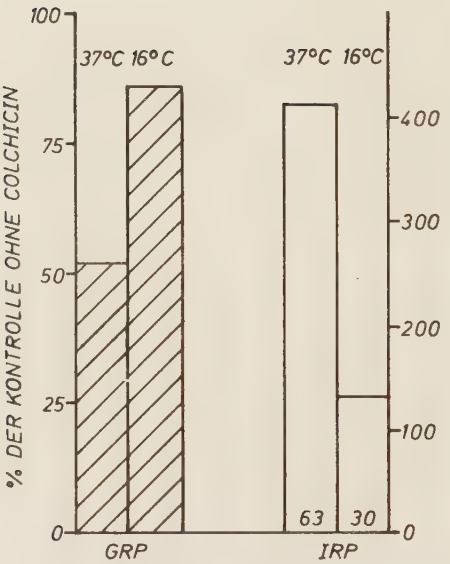


Abb. 31:

Effekt von 10 mM Colchicin auf GRP und IRP. Die Hepatocyten wurden eine Stunde bei 16 oder 37°C inkubiert. Die Säulen geben die Größe von GRP und IRP, bezogen auf eine Kontrolle ohne Colchicin, an. Der intrazelluläre Anteil (in %, bezogen auf den jeweiligen GRP) ist in den Säulen angegeben. Die Werte für 37°C sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Insulin an Hepatocyten (vgl. Abbildungen 21 und 22) in Gegenwart von 10 mM Colchicin auf eine Inaktivierung von Rezeptoren zurückzuführen ist. Die Temperaturabhängigkeit weist darauf hin, daß diese Inaktivierung vermutlich intrazellulär abläuft. Die Scatcharddiagramme in Abbildung 32 schließen aus, daß die Bindungsabnahme auf eine veränderte Affinität der Rezeptoren zurückzuführen ist (vgl. auch Tabelle 5). Der Unterschied zu den Ergebnissen von Terris et al. (311), die mit 9 mM Colchicin bei 30°C sogar eine Erhöhung der spezifischen Insulinbindung an Hepatocyten fanden, ist unklar. Da Terris et al. ohne Insulinabbauinhibitor inkubierten, könnte der Anstieg der Bindung durch die Inhibierung des Insulinabbaus durch Colchicin (vgl. Abbildung 23) verursacht werden.

Diese hohen Colchicinkonzentrationen führen zu einem weiteren, qualitativ anderen Effekt. Die Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors wurde in Gegenwart von 10 mM Col-

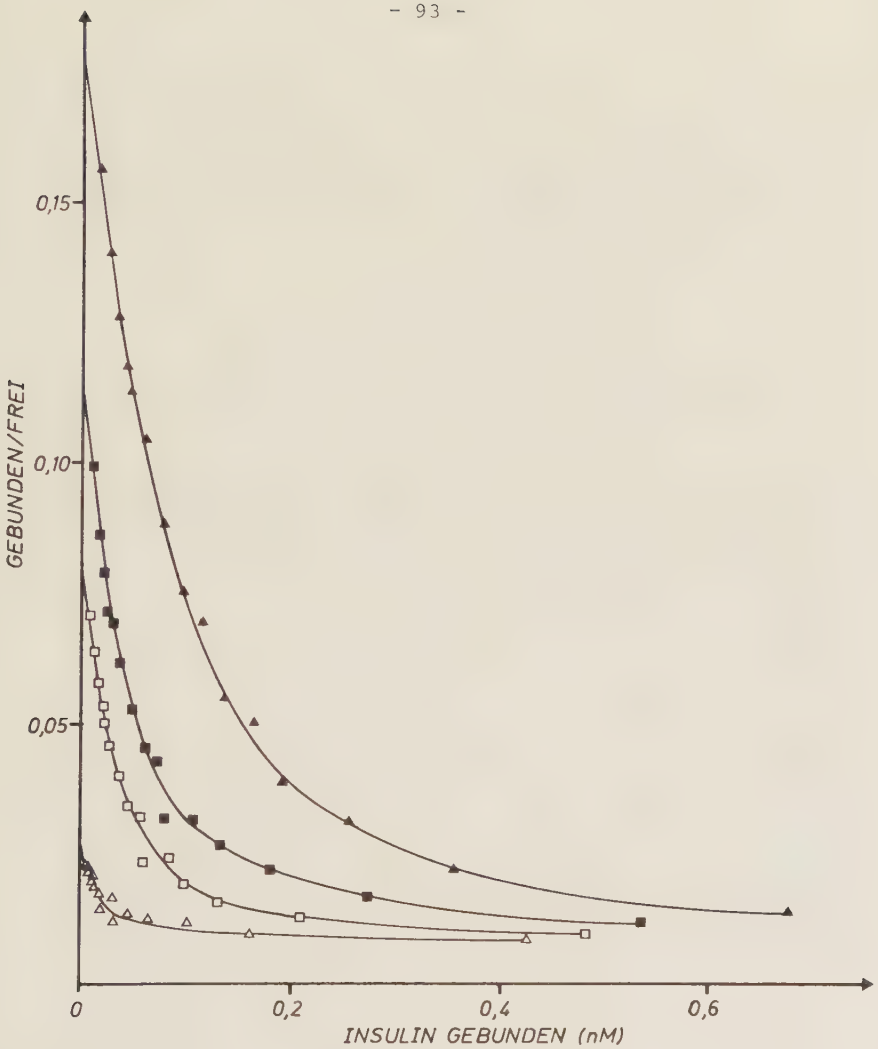


Abb. 32: Scatcharddiagramme der Insulinbindung in CON A-Eluaten. Die CON A-Eluate wurden aus Hepatocyten hergestellt, die 60 Minuten bei 37°C ohne Zusätze (▲ △) oder in Gegenwart von 10 mM Colchicin und 100 nM Insulin (■ □) vorinkubiert wurden. Für jede Inkubationsbedingung wurde nach Ende der Vorinkubation jeweils ein Ansatz trypsinverdaut (△ □). Die Inkubation mit Colchicin und Insulin führte dazu, daß der IRP, verglichen mit der Kontrolle, deutlich größer wurde und dadurch die Dissoziationskonstante für die intrazellulären Rezeptoren besser bestimmt werden konnte (vgl. Tabelle 5).

chicin trotz Inkubation bei 16°C verhindert, wobei die spezifische Bindung von ^{125}J-MABI an die Hepatocyten kaum inhibiert wurde (nicht gezeigt). Die Ursache dieses Verhaltens, welches bei kleineren Colchicinkonzentrationen nicht auftrat, ist unbekannt.

4.9. Internalisierung des photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptors

Der im vorangegangenen Abschnitt gezeigte Anstieg des IRP in Gegenwart von Insulin steht im Einklang mit einer Internalisierung von Insulin samt seinem Rezeptor. Durch Photoaffinitätsmarkierung konnte direkt gezeigt werden, daß der Insulin-Rezeptor-Komplex internalisiert wird.

Wenn Hepatocyten unmittelbar nach der Markierung des Rezeptors trypsinverdaut wurden, konnte bei Elektrophorese des extrahierten Rezeptors nur noch eine Bande gefunden werden (Abbildung 33 A, E). Wurden die Zellen nach der Markierung jedoch bei 37°C weiterinkubiert, so ergab sich ein neues Bild. Bereits nach 10 Minuten tauchten die für den nichtverdauten Rezeptor charakteristischen Banden wieder auf (Abbildung 33 C, F). Nach Weiterinkubation in Gegenwart von 10 nM Insulin war kein zusätzlicher Effekt zu sehen, da bei diesen Versuchen sowieso mit MABI besetzte Rezeptoren beobachtet wurden (Abbildung 33 G). In Gegenwart von 1 mM Colchicin erscheint insbesondere die Bande 1 mit größerer Intensität wieder als in den Parallelansätzen ohne Zusätze. Dabei ist ohne Einfluß, ob Insulin anwesend ist oder nicht (Abbildung 33 D, H).

4.10. Rezeptorabbau

In Abbildung 28 wurde gezeigt, daß der intrazelluläre Anteil am GRP während zwei Stunden bei 37°C nahezu konstant bleibt. Sowohl der GRP als auch der IRP nehmen während dieser Zeit jedoch deutlich ab (Abbildung 34). Entsprechend binden Hepatocyten immer weniger ^{125}J-Insulin, je länger sie bei 37°C vorinkubiert wurden (Abbildung 35). Die Abbildung 36 zeigt die spezifischen Bindungen von CON A-Eluaten aus mehreren unabhängigen Experimenten, die nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 16 oder 37°C gewonnen wurden. Außerdem ist die spezifische Bindung verschieden lange vorinkubierter Hepatocyten (vgl. Abbildung 35) an einem Beispiel eingezeichnet. Das Diagramm zeigt, daß bei 37°C die Rezeptorzahl der Hepatocyten konstant abnimmt, bei 16°C ist dagegen kein Rezeptorabbau oder Rezeptorinaktivierung zu beobachten.

In einigen Versuchen wurde der Effekt von Insulin auf den GRP untersucht. Nach 50-60 Minuten Vorinkubation bei 37°C mit verschiedenen Insulinkonzentrationen und anschließender Dissoziation (2 x 30 Minuten in jeweils frisches Dissoziationsmedium ohne Insulin) wurden Tritonextrakte und CON A-Eluate hergestellt. Dabei ergab sich das in Abbildung 37 gezeigte Bild. Nach Vorinkubation mit Insulin wurden höhere Rezeptormengen gefunden als nach Vorinkubation ohne Insulin. In entsprechenden Versuchen bei 23°C (auch die Dissoziation wurde bei 23°C durchgeführt) war nur ein minimaler Unterschied festzustellen. Der Insulineffekt bei 37°C konnte auch an Hepatocyten direkt demonstriert werden (Abbildung 38). Dieses Verhalten läßt sich auf dreierlei Art deuten:

i) Insulin erhöht die Affinität des Insulinrezeptors
ii) Insulin aktiviert vorher inaktive Rezeptoren
iii) Insulin inhibiert den Rezeptorabbau

Ein Effekt von Insulin auf die Affinität der Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 39 und Tabelle 5).

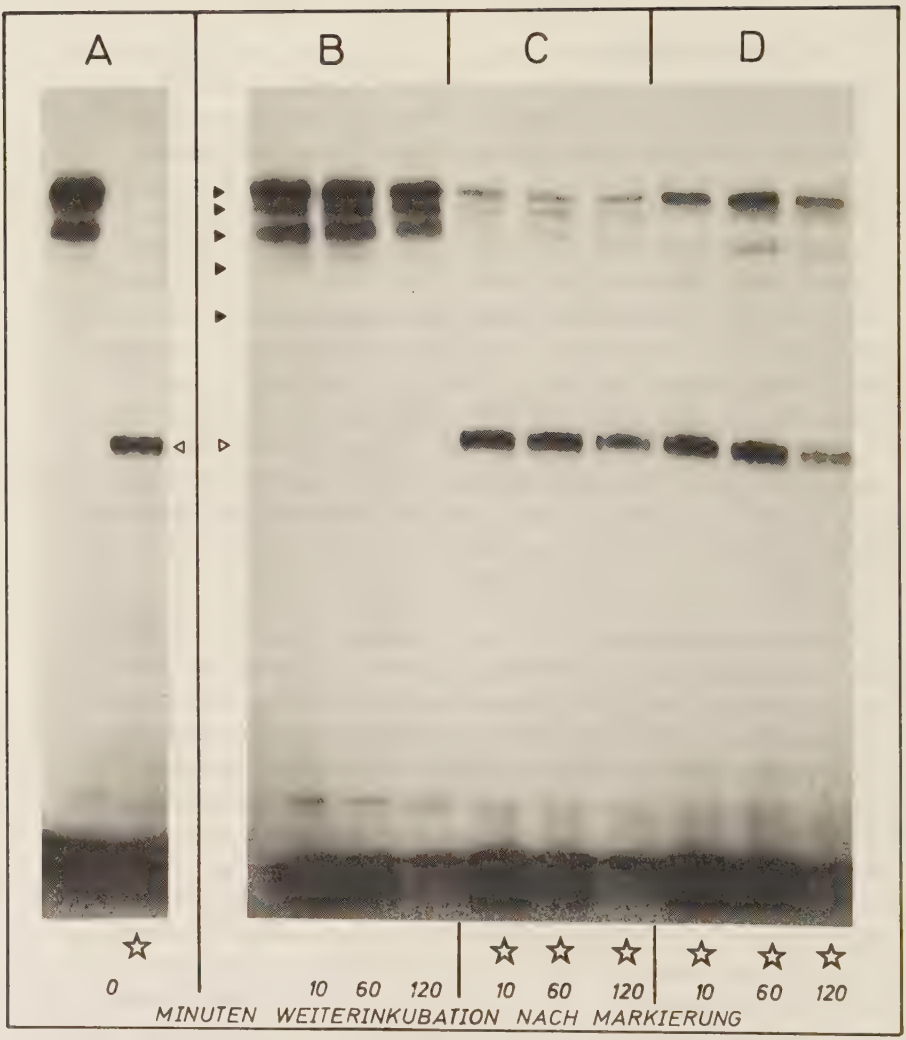
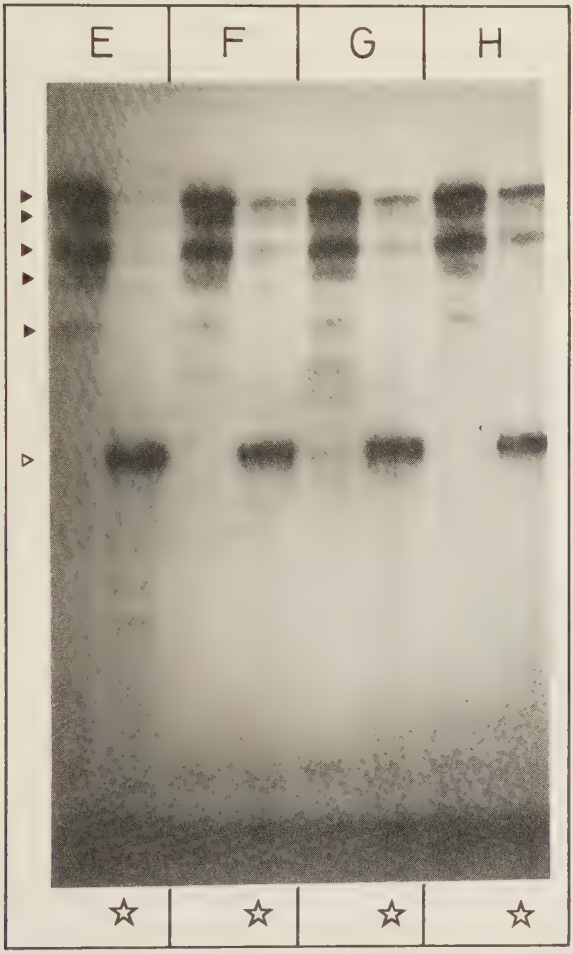


Abb. 33: SDS-PAGE des Insulinrezeptors nach Photoaffinitätsmarkierung in Hepatocyten. Nach der Markierung wurden die Hepatocyten abzentrifugiert und bei 37°C unter verschiedenen Bedingungen weiterinkubiert. Durch Trypsinverdauung (☆) wurden die Oberflächenrezeptoren zerstört, sodaß die Internalisierung des kovalenten Insulin-Rezeptor-Komplexes demonstriert werden konnte (weitere Erläuterungen s. Text). Die geschlossenen Dreiecke markieren die Banden 1-5 des nichtreduzierten Rezeptors, das offene Dreieck markiert die Rezeptorbande, die durch



Trypsinverdauung entsteht. Die Bedingungen der Weiterinkubation im einzelnen waren:

A) Ohne Weiterinkubation
B) Weiterinkubation in IM/0,1 % Alb/0,08 % Bacitracin
C) Wie B), nach Weiterinkubation wurde trypsinverdaut
D) Weiterinkubation in Gegenwart von 1 mM Colchicin und 10 nM Insulin, anschließend Trypsinverdauung
E) Ohne Weiterinkubation
F) Eine Stunde Weiterinkubation wie B)
G) wie F), jedoch mit 10 nM Insulin im Medium
H) wie F), jedoch mit 1 mM Colchicin im Medium

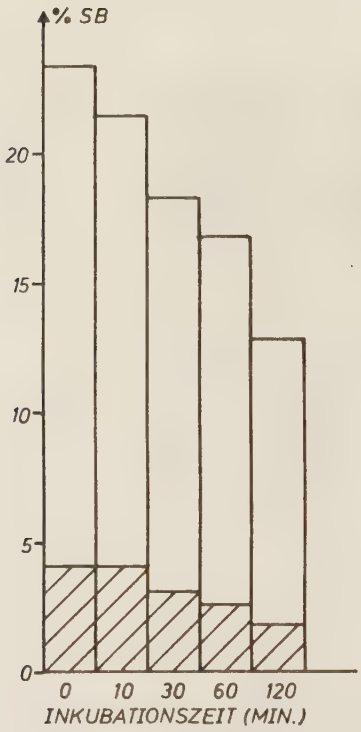


Abb. 34:

GRP und IRP von Hepatocyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C wurden die Hepatocyten abzentrifugiert und tritonextrahiert. Die Extrakte wurden CON A-gefällt und die CON A-Eluate wurden mit ^{125}J-Insulin inkubiert, um die SB als Maß für den Gehalt an Rezeptoren zu messen. Für jeden Zeitpunkt wurde ein Parallelansatz trypsinverdaut, um den intrazellulären Anteil der Rezeptoren zu bestimmen (schraffierter Teil der Säulen). Die Säulen geben Mittelwerte aus zwei bis fünf Bestimmungen aus verschiedenen Zellpräparationen wieder.

Die Abbildung 39 zeigt außerdem, daß das Bindungsverhalten durch die Temperatur, bei der vorinkubiert wurde, nicht beeinflußt wurde. Nach Abbildung 40 wäre eine minimale Aktivierung inaktiver Rezeptoren ("Up-Regulation") denkbar, wenn man die Meßwerte nach zehnminütiger Inkubation betrachtet. Da jedoch bei Inkubationszeiten bis zehn Minuten auch einzelne Meßwerte ohne Insulin über dem Wert ohne Vorinkubation (≙ 100 %) lagen und andererseits dieser eventuelle Insulineffekt nicht in jedem Experiment reproduziert werden konnte, erscheint es sehr unwahrscheinlich, daß tatsächlich Up-Regulation stattfindet. Damit bleibt zur Erklärung des Insulineffekts bei 37°C auf den GRP nur die Inhibierung des Rezeptorabbaus.

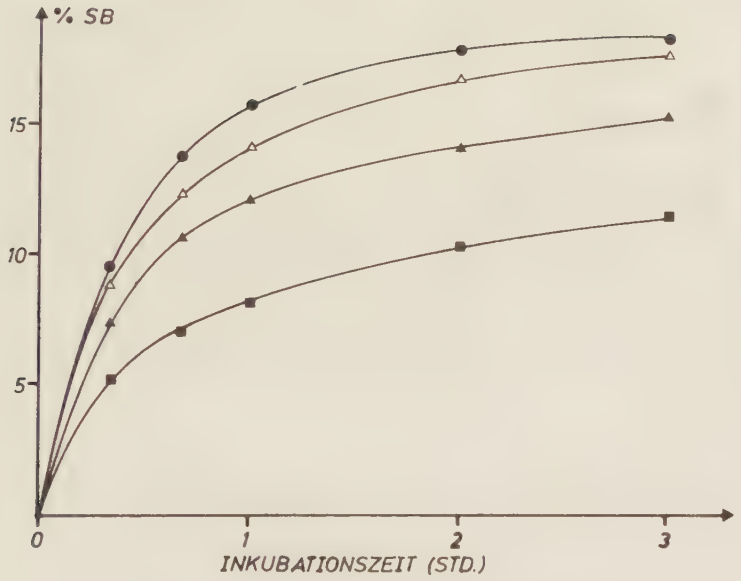


Abb. 35: Abnahme der Bindung von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten mit der Zeit. Hepatocyten wurden 10 (●), 30 (△), 50 (▲) oder 120 (■) Minuten bei 37°C vorinkubiert. Nach diesen Zeiten wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem Medium die Inkubation mit ^{125}J-Insulin gestartet. Die Assoziation wurde bei 23°C durchgeführt.

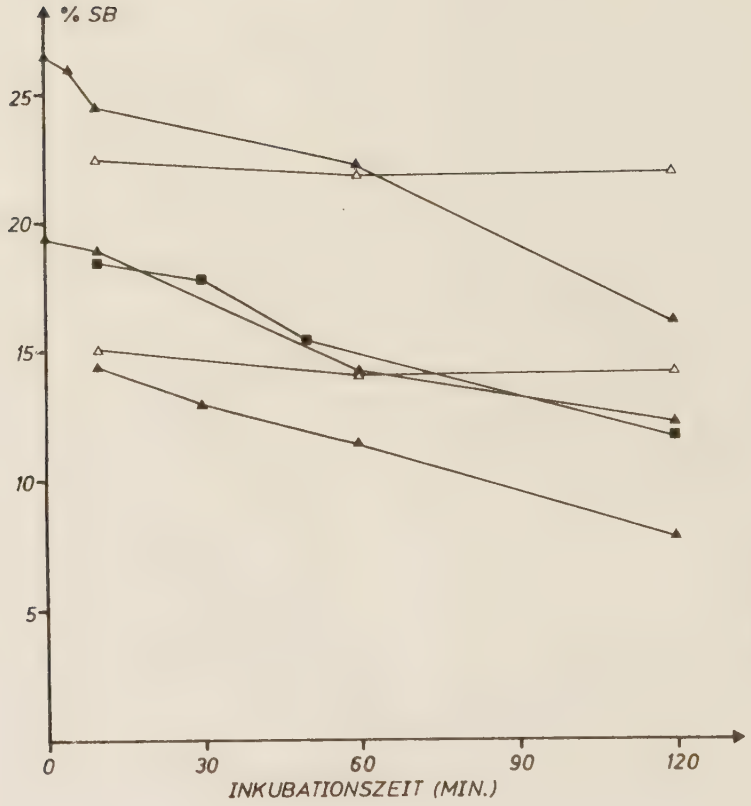


Abb. 36: GRP von Hepatocyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Hepatocyten wurden entweder bei 16°C (△) oder 37°C (▲) inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden sie abzentrifugiert, tritonextrahiert und die Extrakte CON A-gefällt. Die Kurven zeigen die spezifische Bindung von ^{125}J-Insulin der CON A-Eluate. Zusätzlich ist die spezifische Bindung an Hepatocyten nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 37°C (■) eingezeichnet (vgl. Abbildung 35). Jede Kurve stammt aus einer separaten Hepatocytenpräparation.

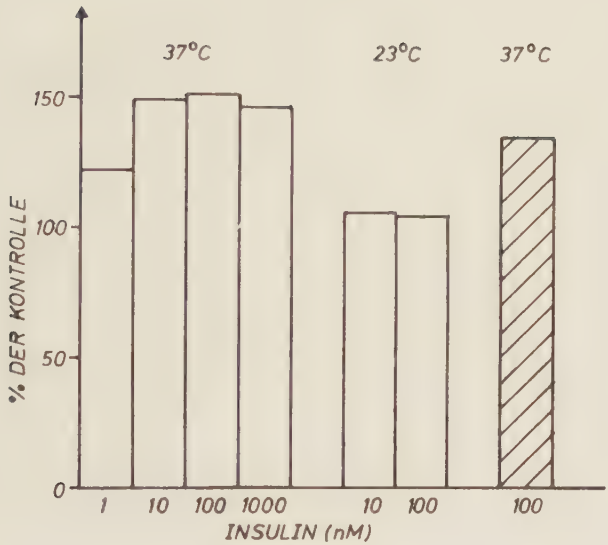


Abb. 37: Effekt von Insulin auf den GRP in Hepatocyten. Die Zellen wurden bei 23 oder 37°C mit den angegebenen Insulinkonzentrationen inkubiert, nach einer Stunde zentrifugiert und in insulinfreies Medium überführt. Nach 20 Minuten wurden sie erneut zentrifugiert und weitere 20 Minuten in insulinfreiem Medium gehalten, um gebundenes Insulin möglichst vollständig entfernen zu können. Die Inkubationen in insulinfreiem Medium erfolgten ebenfalls bei 23 bzw. 37°C. Anschließend wurden die Hepatocyten tritonextrahiert und der Extrakt CON A-gefällt. Die spezifischen Bindungen von ^{125}J-Insulin in den CON A-Eluaten sind auf Kontrollen ohne Insulin bezogen. Die 37°C-Werte sind aus vier bis fünf unabhängigen Experimenten gemittelt. Zum Vergleich ist die Bindung an Hepatocyten (Mittelwert aus zwei verschiedenen Zellpräparationen) nach Vorinkubation mit 100 nM Insulin gezeigt (schraffierte Säule). Das Verfahren war wie oben beschrieben, lediglich die Inkubationen in insulinfreiem Medium wurden auf zweimal 30 Minuten ausgedehnt. Danach wurde bei 23°C mit ^{125}J-Insulin inkubiert (vgl. Abbildung 38).

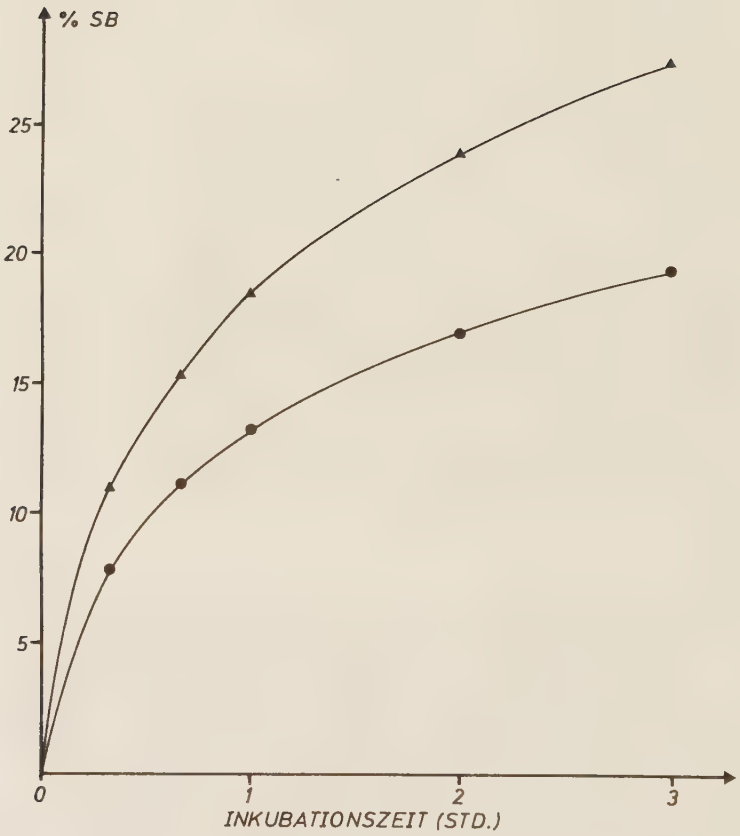


Abb. 38: Bindung von ^{125}J-Insulin an Hepatocyten nach Vorinkubation mit nativem Insulin. Die Zellen wurden eine Stunde mit 100 nM Insulin (▲) bzw. ohne Insulin (●) bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie abzentrifugiert und zweimal 30 Minuten in frischem, insulinfreiem Medium weiterinkubiert, um gebundenes Insulin möglichst weitgehend zu entfernen. Anschließend wurden die Hepatocyten bei 23°C mit ^{125}J-Insulin inkubiert.

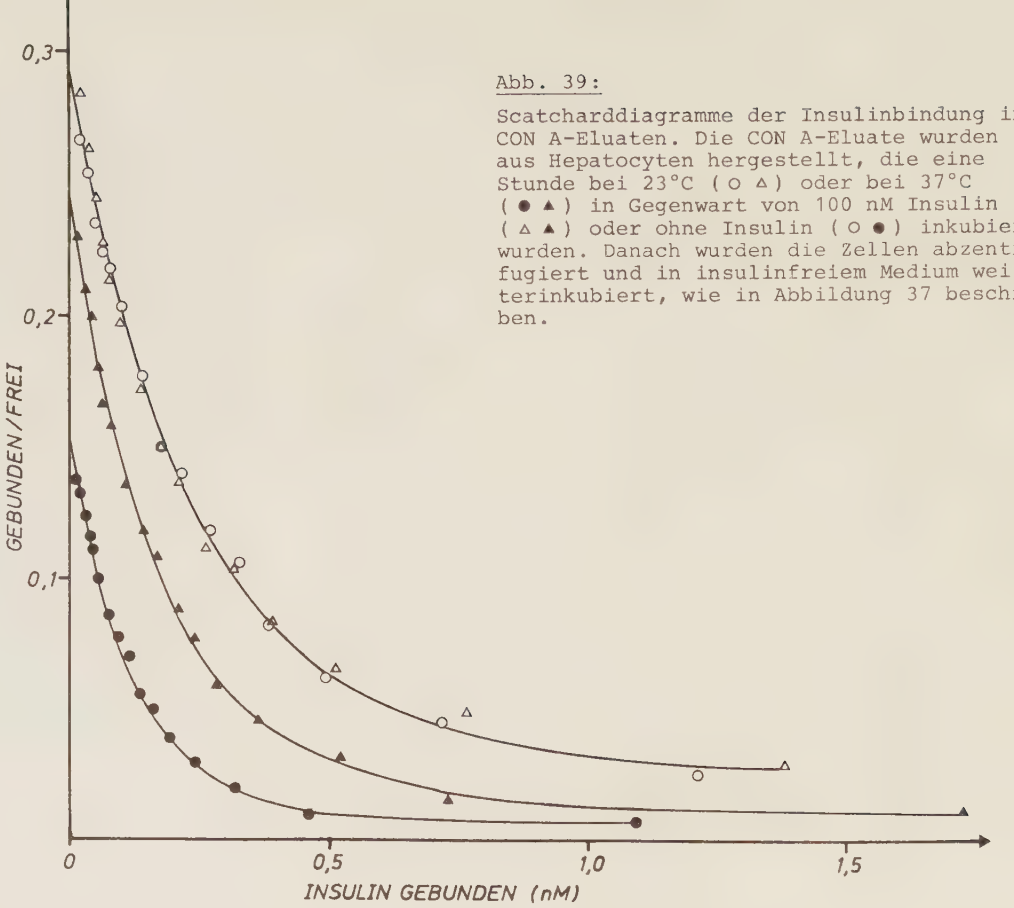


Abb. 39:

Scatcharddiagramme der Insulinbindung in CON A-Eluaten. Die CON A-Eluate wurden aus Hepatocyten hergestellt, die eine Stunde bei 23°C (○ △) oder bei 37°C (● ▲) in Gegenwart von 100 nM Insulin (△ ▲) oder ohne Insulin (○ ●) inkubiert wurden. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und in insulinfreiem Medium weiterinkubiert, wie in Abbildung 37 beschrieben.

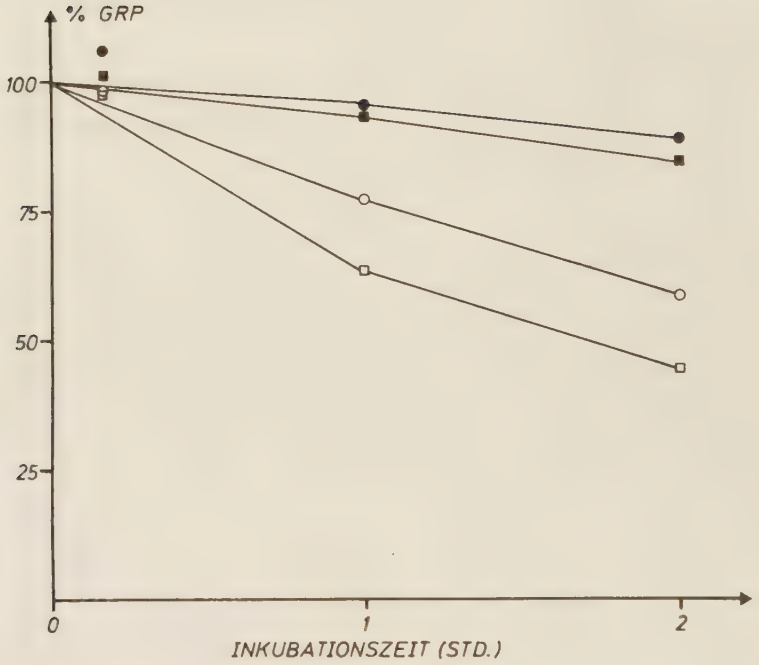


Abb. 40: GRP von Hepatocyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Zellen wurden in Gegenwart von 1 mM Colchicin (□), 10 nM Insulin (●), 1 mM Colchicin und 10 nM Insulin (■) oder ohne Zusätze (○) inkubiert. Alle Ansätze enthielten wie üblich 0,8 mg/ml Bacitracin. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Hepatocyten abzentrifugiert und einer Waschprozedur unterzogen, wie sie in 3.12. für trypsinverdaute Zellen bzw. die Kontrollzellen beschrieben ist. Anschließend wurde tritonextrahiert und CON A-gefällt. Die CON A-Eluate wurden mit ^{125}J-Insulin inkubiert und die gemessenen spezifischen Bindungen auf die jeweiligen Messungen zu Beginn der Inkubation bezogen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus drei bis fünf verschiedenen Hepatocytenpräparationen.

In Abbildung 40 ist außerdem zu erkennen, daß Colchicin (1 mM) den Rezeptorabbau minimal beschleunigt, was als Konsequenz der Akkumulation der Rezeptoren im Zellinnern interpretiert werden könnte, da anzunehmen ist, daß der Rezeptorabbau intrazellulär stattfindet.

Ein weiteres Indiz für die Inhibierung des Rezeptorabbaus ergibt sich aus den Inkubationen bei 23°C. Bei dieser niedrigen Temperatur war, wie oben erwähnt, nur ein minimaler Insulineffekt zu messen (Abbildung 37). Die spezifische Bindung der CON A-Eluate lag außerdem auch nach Vorinkubation ohne Insulin bei 23°C höher als nach Vorinkubation bei 37°C mit Insulin. Dies deutet darauf hin, daß bei 23°C der Rezeptor nicht oder nur wenig abgebaut wird, sodaß auch kein Insulineffekt im Sinne einer Abbauinhibierung gemessen werden kann.

Die Abbildung 33 B zeigt, daß bei Weiterinkubation (bis zu zwei Stunden bei 37°C) von Hepatocyten nach Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors immer dasselbe elektrophoretische Bandenmuster erhalten wurde. Da keine radioaktiven Rezeptorbruchstücke nachgewiesen werden konnten, kann gefolgert werden, daß der Rezeptor, sofern er mit ^{125}J-MABI besetzt ist, nicht abgebaut wird. Auch dies ist ein starker Hinweis darauf, daß in Gegenwart von Insulin der Rezeptorabbau blockiert ist.

5. D I S K U S S I O N

5.1. Eigenschaften der Insulinbindung in Hepatocytensuspensionen

5.1.1. Bindung von ^{125}J-Insulin

Das bei pH 8 gefundene Optimum der Insulinbindung an den Insulinrezeptor in Hepatocyten stimmt etwa mit den von anderen Autoren sowohl für den gelösten Rezeptor und Membranen (136, 180, 191, 192, 241, 333) als auch für den Rezeptor in isolierten Zellen (104, 241, 274, 301) gefundenen Werten überein. Von Shafie et al. (298) wurde in verschiedenen Rattenzellen neben einem Optimum bei pH 7,7 noch ein zweites bei pH 8,8 (in Fettzellen nur bei pH 8,8) gefunden. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, wird die Insulinbindung bei längeren Inkubationszeiten bei pH 7,4 optimal, da oberhalb des physiologischen pH-Wertes, insbesondere bei pH 8,3, die Vitalität der Hepatocyten stark abnimmt. Daher erscheint eine Untersuchung des pH-Bereiches oberhalb pH 8 wenig sinnvoll.

Der zeitliche Verlauf der Assoziation von ^{125}J-Insulin wird von den Inkubationsbedingungen stark beeinflußt. Wegen der Temperaturabhängigkeit des Insulinabbaus, der Internalisierung von Insulin und des Rezeptorabbaus spielt die Inkubationstemperatur eine große Rolle. Bei höheren Temperaturen ist eine Bindung von ^{125}J-Insulin nur in Gegenwart von Bacitracin als Inhibitor des Insulinabbaus zu messen (Abbildung 5). Ein Bindungsgleichgewicht ist oberhalb von 23°C jedoch nicht zu erreichen (41, 61, 74). Dafür ist der bei höheren Temperaturen durch Bacitracin nicht vollständig inhibierte Insulinabbau (vgl. Abbildung 11 und (61)) und der Rezeptorabbau (Abbildung 34, 36 und 40) verantwortlich zu machen. Eine Möglichkeit, die Insulinbindung unter Gleichgewichts-

bedingungen untersuchen zu können, bietet die Inkubation bei 16°C, da bei dieser Temperatur die Internalisierung, der Rezeptorabbau und in Gegenwart von Bacitracin auch der Insulinabbau inhibiert sind. Unter diesen Inkubationsbedingungen liefert die Insulinbindung an Hepatocyten nichtlineare Scatcharddiagramme (Abbildung 6), wie sie mit einigen Ausnahmen (32, 74) von vielen Autoren gefunden wurden (23, 62, 66, 198, 214, 301). Zur Erklärung der Nichtlinearität werden aus der Reihe der möglichen Ursachen vor allem negative Kooperativität (66, 244), Heterogenität der Bindungsstellen (48, 164, 244) oder Insulinabbau (32, 74, 229) herangezogen. In der vorliegenden Arbeit scheidet Insulinabbau als Ursache aus, da dieser bei 16°C in Gegenwart von Bacitracin inhibiert ist (Abbildung 11).

Als Indiz für negative Kooperativität wird allgemein die beschleunigte Dissoziation von gebundenem ^{125}J-Insulin in Gegenwart von nativem Insulin gewertet (66, 78, 108, 244). Ausgehend von der Annahme, daß das native Insulin durch Bindung an unbesetzte Rezeptoren die gesamte Rezeptorbesetzung vergrößert, erscheint dieser Ansatz korrekt. Wie Frank und Davidson (95) und Pollet et al. (264) an Hepatocyten bzw. Lymphocyten zeigten, ist die Dissoziationsrate aber unabhängig von der Rezeptorbesetzung. Durch Experimente mit zwei verschieden markierten Insulinen kamen Corin und Donner (47) mit Lebermembranen zum selben Ergebnis. Diese Autoren zeigten außerdem, daß zwar die Dissoziation von ^{125}J-Insulin in Gegenwart von ^{131}J-Insulin beschleunigt wird, die Gesamtrezeptorbesetzung (^{125}J- plus ^{131}J-Insulin) während der Dissoziation jedoch ebenfalls abnimmt, womit die Voraussetzung der zunehmenden Rezeptorbesetzung (s.o.) nicht erfüllt ist. Für die Beschleunigung der Dissoziation von radioaktivem Liganden in Gegenwart von nativem Liganden wird die Konkurrenz von markiertem und unmarkiertem Liganden bei der Wiederbindung während der Dissoziation als Ursache diskutiert (73, 75). Das Konzept der negativen Kooperativität wird durch diese Ergebnisse in Frage gestellt.

Heterogenität des Rezeptors als Ursache der nichtlinearen Scatchardplots ist denkbar, zumal in der Elektrophorese verschiedene Rezeptorbanden gefunden wurden (Abbildungen 17 und 18). Zumindest für die Rezeptorbanden 1 und 3 konnte aber gezeigt werden, daß sich bei Inkubation zur Photoaffinitätsmarkierung in Gegenwart steigender Konzentrationen an nativem Insulin deren Intensitätsverhältnis nicht ändert, d.h. die Bindung von ^{125}J-MABI erfolgte an beiden Banden mit gleicher Affinität (nicht gezeigt). Wegen des Auftretens der Banden 2 und 4 bleibt Heterogenität als Ursache der nichtlinearen Scatcharddiagramme jedoch möglich.

Es ist nicht auszuschließen, daß andere Ursachen wie die Heterogenität des Liganden (178, 260, 309), ungenaue Bestimmung der unspezifischen Wechselwirkungen des Liganden (83, 220, 254) und Ligand-Ligand-Wechselwirkungen (239) ebenfalls oder sogar ausschließlich für die Nichtlinearität verantwortlich zu machen sind.

Aus nichtlinearen Scatcharddiagrammen lassen sich Assoziations- bzw. Dissoziationskonstanten (184) und Konzentration bzw. Anzahl der Bindungsstellen (185) nicht zuverlässig bestimmen. Die gezeigten Diagramme sollen daher lediglich dazu dienen, Bindungseigenschaften von Rezeptoren mit unterschiedlicher Vorgeschichte (Inkubation z.B. mit Insulin oder Colchicin) oder unterschiedlicher Lokalisation in der Zelle (Zelloberfläche oder intrazellulär) zu vergleichen. Aus diesem Vergleich läßt sich folgendes ableiten:

i) Die Affinität des Rezeptors ändert sich nicht unter dem Einfluß von Insulin.
ii) Agenzien wie Bacitracin oder Colchicin haben keinen Effekt auf die Affinität des Rezeptors.
iii) Intrazelluläre Rezeptoren zeigen dieselben Bindungseigenschaften wie solche auf der Zelloberfläche. Rezeptoren der Zelloberfläche wurden zwar nicht separat untersucht, da aber die Rezeptoren des GRP die gleichen Eigenschaften zeigen wie die des IRP, scheint dieser Schluß zulässig.

5.1.2. Insulinabbau

Insulinabbau konnte in verschiedenen Zellen wie Hepatocyten (32, 38, 103, 261, 310), Fettzellen (110, 166, 214), Fibroblasten (8) und Lymphocyten (301) nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß gebundenes Insulin nach Internalisierung von der Zelle in den Lysosomen abgebaut wird (9, 38, 199, 214, 311, 323), jedoch konnte neben diesem rezeptorvermittelten Abbau auch Abbau unabhängig von der Rezeptorbindung gefunden werden (38, 77, 103, 301). Der Abbau durch nichtlysosomale Enzyme scheint nicht in Verbindung zur Rezeptorbindung zu stehen. Eine weitere Quelle für rezeptorunabhängigen Insulinabbau ist das "Ausbluten" proteolytischer Enzyme ins Medium (38, 103).

Auch Membranpräparationen aus verschiedenen Geweben und Membranextrakte besitzen Insulinabbauaktivität (81, 132, 164, 237, 241). Als nichtlysosomale Abbauenzyme wurden Glutathion-Insulin Transhydrogenase (320) und eine Insulin-Protease (28, 80) identifiziert.

Wie in den Abbildungen 10 bis 12 gezeigt ist, entfalten die hier verwendeten Hepatocytensuspensionen eine beträchtliche Abbaukapazität, wovon ein großer Teil extrazellulär zu finden ist. Bei 16 und 23°C kann der Abbau durch Bacitracin, einen oft verwendeten Abbauinhibitor (38, 82, 88, 213), inhibiert werden, bei höheren Temperaturen wird die Inhibition unvollständig (vgl. Abbildung 11). Da Bacitracin nur den rezeptorunabhängigen Abbau inhibiert (38, 110, 134, 301), ist dieser durch Bacitracin nicht inhibierbare Abbau vermutlich rezeptorvermittelt, da er auch erst unter Bedingungen, die Internalisierung erlauben, stattfindet. Da auch die Glutathion-Insulin Transhydrogenase von Bacitracin inhibiert wird (284), besteht die Möglichkeit, daß dieses Enzym eine Rolle beim rezeptorunabhängigen Abbau spielt.

Diese Zusammenstellung verschiedener Ergebnisse zeigt, daß auf die Frage nach der Funktion des Insulinabbaus keine

einfache Antwort zu geben ist. Zudem werden Untersuchungen teilweise durch extrazellulären Abbau (s.o.), der als unphysiologisch anzusehen ist, erschwert. Eine Aufgabe, nämlich die Regulation oder Termination des Insulinsignals, wird jedoch allgemein angenommen (77, 134, 199, 310). Es ist denkbar, daß mit dem Abbau eine Vermittlung von Insulinsignalen verbunden ist (303, 323). Gegen diese Hypothese spricht jedoch, daß für Kurzzeiteffekte von Insulin wie Stimulation der Glucoseoxidation oder Aktivierung des Glucosetransports in Fettzellen gezeigt werden konnte, daß sie unabhängig vom lysosomalen Insulinabbau sind (133, 134, 215). Außerdem können Insulineffekte auch durch Moleküle ohne strukturelle Verwandtschaft wie Insulinrezeptorantikörper (7, 208, 317) oder CON A (55, 142) ausgelöst werden.

5.1.3. Dissoziation

Dissoziationsexperimente wurden durchgeführt, um einerseits kovalente Markierung des Rezeptors mit ^{125}J-MABI oder ^{125}J-DABI (vgl. 4.4.2.) und andererseits die Internalisierung von ^{125}J-Insulin nachzuweisen (vgl. 4.7.). Unabhängig davon, ob durch Zugabe von nativem Insulin oder durch Überführen in ^{125}J-insulinfreies Medium (mit oder ohne nativem Insulin) dissoziiert wurde, zielten die Versuche darauf, möglichst vollständige Dissoziation in überschaubaren Zeiten zu erreichen. Daher wurde gewöhnlich bei 28°C (wenn die Assoziationstemperatur höher lag, bei dieser Temperatur) und wegen der Steigerung der Dissoziationsrate durch Insulin im Dissoziationsmedium (vgl. Abbildung 7) mit 100 nM (oder 5,1 µM) Insulin im frischen Medium dissoziiert (vgl. 4.2.).

Der Nachweis der Insulininternalisierung mittels Dissoziationsversuchen wird in 5.3.1. diskutiert. Dissoziationsversuche in Gegenwart und Abwesenheit von nativem Insulin werden häufig verwendet, um negative Kooperativität der Insu-

lin-Rezeptor-Bindung nachzuweisen. Die Problematik dieser Experimente wurde bereits in 5.1.1. angedeutet.

5.2. Struktur des Insulinrezeptors in Hepatocyten

5.2.1. Gelfiltration

In Rattenleber wurde von einer Reihe von Autoren durch Gelfiltration von Tritonextrakten ein Rezeptorpeak gefunden (141, 154, 171, 258, 333), andere dagegen identifizierten jeweils zwei Peaks (14, 191, 224, 225). Wurde der Insulinrezeptor in Hepatocyten photoaffinitätsmarkiert und nach Tritonextraktion über Sepharoxe CL 6B gelfiltriert, konnte nur ein Peak erhalten werden (Abbildung 15). Da bei der Photoaffinitätsmarkierung nur die Rezeptoren der Plasmamembran markiert werden, war die Annahme naheliegend, daß der von Koch (191) gefundene zweite Rezeptorpeak, der mit dem in dieser Arbeit gelegentlich auftauchenden Peak II (vgl. Abbildung 15) nichts zu tun hat, nur in der von ihm verwendeten mikrosomalen Membranfraktion zu finden ist. Durch Tritonextraktion aller zellulären Rezeptoren mit anschließender Gelfiltration über Sepharose CL 4B analog zu Koch (vgl. 4.5.1.) konnte jedoch ebenfalls nur ein Peak nachgewiesen werden. Die Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse ist noch nicht geklärt. Weitere Aspekte zu diesem Problemkreis werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

5.2.2. SDS-PAGE

Ein genaueres Bild von seiner Struktur erhält man durch SDS-PAGE des photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptors. Im nichtreduzierten Zustand wurden in unterschiedlichen Inten-

sitäten 5 Banden mit Molekulargewichten von 245.000 bis 390.000 gefunden (Abbildung 17 und Tabelle 3). Nach Reduktion blieben bei allen in dieser Arbeit untersuchten Proben zwei Banden (I und II) mit einem Molekulargewicht von 115.000 und mit größerer Intensität von 130.000 zurück. Während die Banden 1-4 durch partielle Reduktion (0,4 - 2 mM Mercaptoethanol) an Intensität verloren, wurde Bande 5 intensiver und außerdem traten die Banden 6-8 auf. Von den nichtreduzierten Banden 1-5 sind die Banden 1 und 3 als Hauptbanden anzusehen, da sie immer mit der größten Intensität zu finden waren. Bande 5 muß trotz Abwesenheit von Reduktionsmittel bereits als ein Reduktionsprodukt der höhermolekularen Banden angesehen werden, da sie bei schwacher Reduktion intensiver wird (Abbildungen 17 und 18). Daher wird angenommen, daß der Insulinrezeptor in Hepatocyten durch die vier Banden vom Molekulargewicht 290.000, 320.000, 360.000 und 390.000 charakterisiert ist. Es wird weiter angenommen, daß diese vier Banden eine enge strukturelle Verwandtschaft besitzen, da sie durch Trypsinverdauung nur eine Bande (MG 150.000, Abbildung 33) und durch Reduktion nur zwei Banden (I und II) liefern. In einem Vorversuch mit zweidimensionaler Elektrophorese (erste Dimension nicht reduziert, zweite Dimension reduziert, jeweils Laemmligele) entstanden die zwei Reduktionsbanden außerdem aus jeder der vier hochmolekularen Banden. Die Frage nach der Art der strukturellen Beziehung der verschiedenen Banden ist noch nicht geklärt.

Der Vergleich der reduzierten Rezeptorbanden mit der Literatur zeigt insofern Übereinstimmung, daß fast alle Autoren eine Hauptbande mit einem Molekulargewicht von etwa 120.000 bis 130.000 angeben (vgl. 1.1.), die der Bande I in Abbildung 17 entsprechen dürfte. Diese Bande wurde unabhängig von der Markierungstechnik gefunden und dürfte die insulinbindende Untereinheit darstellen. Bezüglich weiterer Rezeptoruntereinheiten herrscht noch kein einheitliches Bild. Eine Untereinheit vom Molekulargewicht von 90.000 bis 95.000, wie sie von vielen Autoren z.B. auch in Lebermembra-

nen gefunden wurde (15, 65, 178, 341), konnte in Hepatocyten nicht gefunden werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Fehlmann et al. (89) überein. Die von Fehlmann et al. gefundenen Banden mit Molekulargewicht 130.000 und 125.000 entsprechen möglicherweise den Banden I und II in Abbildung 17. Eine ähnliche Doppelbande nach Reduktion erhielten Berhanu et al. (21) nach Inkubation markierter Fettzellen bei 37°C. Beide Arbeitsgruppen sehen die kleinere Bande als Abbauprodukt an.

Die im nichtreduzierten System gefundenen Banden mit denen der Literatur zu vergleichen, ist recht schwierig, da sowohl die Anzahl als auch die Molekulargewichte der beschriebenen Rezeptorspezies variieren. Die in der SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichte können zudem nur ein sehr vages Vergleichskriterium sein, da zum einen im fraglichen Molekulargewichtsbereich keine Markerproteine zur Verfügung stehen und zum anderen der Insulinrezeptor als Glycoprotein in der SDS-PAGE atypisches Laufverhalten zeigt (96, 193, 262, 341). Bei den Überlegungen zu strukturellen Zusammenhängen der gefundenen Bandenmuster muß außerdem berücksichtigt werden, daß nach Reduktion oder proteolytischen Angriffen in der Zelle oder während der Präparation nur noch die Untereinheiten zu finden sind, die Tracerinsulin kovalent gebunden haben. Je nach Markierungstechnik (138, 173, 338) oder Ausgangsmaterial (64, 179) kann dies zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Unter diesen Aspekten soll darauf verzichtet werden, die hier erhaltenen Ergebnisse mit einem der vorgeschlagenen Rezeptormodelle (15, 57, 342) in Beziehung zu setzen.

Es erscheint jedoch angebracht, die in der vorliegenden Arbeit mit Hepatocyten erhaltenen Bandenmuster (Abbildung 17) mit den in unserer Arbeitsgruppe mit Plasmamembranen aus Rattenleber (65), mikrosomalen Lebermembranen (65, 178) und aus mikrosomalen Lebermembranen partiell gereinigtem Insulinrezeptor (191, 192) erhaltenen zu vergleichen.

Durch direkten Vergleich konnte gezeigt werden, daß die ohne Reduktion gefundenen Banden 1-5 (Abbildung 17) identisch mit denen von Koch et al.(192) für Peak I der Gelfiltration von Tritonextrakt aus mikrosomalen Lebermembranen über Sepharose CL 4B gefundenen Banden sind. Wenn im folgenden von Peak I und II die Rede ist, so sind immer die zwei von Koch (191) gefundenen Rezeptorpeaks gemeint. Der in Abschnitt 4.5.1. beschriebene Peak II eluiert in einer anderen Position als der Peak II von Koch und ist daher nicht identisch mit diesem (vgl. auch 5.2.1.). Die Angaben für die Molekulargewichte der elektrophoretischen Banden stimmen mit denen von Koch et al. (192) nicht genau überein, da sie in Gelen mit unterschiedlicher Acrylamidkonzentration bestimmt wurden. Die Banden der Peak II-Spezies konnten im nichtreduzierten System in Hepatocyten unter keiner Bedingung nachgewiesen werden. Diese traten jedoch in mikrosomalen Lebermembranen (65, 178) und in geringem Maße auch in Plasmamembranen (65) auf. Es zeigt sich also, daß der Peak II vor allem mit mikrosomalem Ausgangsmaterial zu finden ist. Im Widerspruch hierzu steht das Fehlen von Peak II in Tritonextrakten aus ganzen Hepatocyten (vgl. 4.5.1.), was dagegen spricht, daß Peak II eine eigene funktionelle Rezeptorspezies darstellt. Dagegen stützt dieser scheinbare Widerspruch die Vermutung, daß Peak II ein Fragment aus Peak I darstellt (192), für dessen Entstehung die Präparation des mikrosomalen Materials verantwortlich gemacht werden muß. Bei der Präparation von mirkosomalen Lebermembranen aus Hepatocyten nach Photoaffinitätsmarkierung des Rezeptors wurden jedoch ebenfalls keine Peak II-Banden gefunden. Es ist dabei aber zu beachten, daß alle markierten Rezeptoren ausschließlich aus der Plasmamembran stammen (vgl. 4.7.2.).

Die durch partielle Reduktion erhaltenen Banden 6 und 7 (Abbildung 17) liegen im Molekulargewichtsbereich der von Koch et al. (192) beschriebenen Bande aus Peak II mit MG 210.000 (Tabelle 3). Da durch partielle Reduktion von markiertem Peak I die Peak II-Spezies erhalten werden konnte

(194), könnte es sich bei Bande 6 oder 7 um die Peak II-Bande vom MG 210.000 handeln. Die Bande 8 wurde bisher nur nach Markierung des Rezeptors in Hepatocyten gefunden.

Auch nach Reduktion der Elektrophoreseproben traten Unterschiede im Bandenmuster auf, je nachdem in welchem Ausgangsmaterial der Rezeptor markiert wurde. Der Hautpunterschied liegt im Auftreten der Bande II (MG 115.000). Diese ist in Hepatocyten (Abbildung 17) und in Plasmamembranen (65) immer zu finden, während sie in mikrosomalen Membranen nur schwach darzustellen ist (65, 178). Obwohl sie durch Reduktion des markierten Peak II entsteht und dieser wiederum durch partielle Reduktion des markierten Peak I erhalten werden kann (194), wird durch vollständige Reduktion von markiertem Peak I nur Bande I (MG 130.000) erhalten (191, 192).

Die Ursache dieses eigentümlichen Verhaltens ist wohl darin zu suchen, daß der Insulinrezeptor unterschiedlich markiert wird aufgrund unterschiedlicher Konformation in der Plasmamembran, in der mikrosomalen Membran oder in Lösung. Dies erscheint möglich, da sowohl Eigenschaften des Insulinrezeptors als auch Insulinwirkungen von der Membranfluidität abhängen (3, 109, 126). Die unterschiedliche Markierung bietet auch eine Erklärung für die abweichenden Bandenmuster, die durch partielle Reduktion des in Hepatocyten markierten Rezeptors (Abbildung 17) im Vergleich zu denen aus Peak I (194) erhalten wurden. Ebenso ließe sich das uneinheitliche Auftreten einer reduzierten Bande mit einem Molekulargewicht von 90.000 (65, 90, 178) erklären.

Diese kurze Betrachtung zeigt, daß trotz gleicher Markierungsmethode und Untersuchung des gleichen Gewebes gewisse Unterschiede in den Bandenmustern gefunden werden, je nach Aufbereitung des Gewebes vor der Markierung. Zur Aufklärung der strukturellen Beziehungen der Banden untereinander müssen daher weitere Methoden wie "peptide mapping", zweidimensionale Elektrophorese oder Immunpräzipitation herangezogen werden.

5.3. Internalsierung von Insulin und Rezeptor

5.3.1. Dissoziationsexperimente zum Nachweis der Internalisierung von Insulin

Nachdem das Zustandekommen einer kovalenten Insulin-Rezeptor-Bindung ausgeschlossen werden konnte (4.6.), bleiben zur Erklärung des nicht dissoziierbaren Anteils an zellgebundenem ^{125}J-Insulin nur die Internalisierung des Hormons oder die Entstehung einer sehr langsam dissoziierenden Insulinbindung. Das zeitabhängige Entstehen einer solchen Bindung bei 15°C durch Umwandlung besetzter Rezeptoren in eine neue Form wurde von Donner und Corin (76) beschrieben. Steht nur eine Rezeptorform im Gleichgewicht mit dem Hormon, so schlagen sie folgendes Modell vor:

$$H + R \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} HR \underset{k_{-2}}{\overset{k_2}{\rightleftharpoons}} HR'$$

Dabei steht R' für die zweite Rezeptorform, die zur langsameren Dissoziation des Hormons (H) führt, wenn $k_{-1} \gg k_{-2}$. Dann erhält man nach anfänglich schneller Dissoziation eine langsamere Dissoziationsphase, in der k_{-2} geschwindigkeitsbestimmend wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei entsprechender Temperatur (16°C) keine Akkumulation von nicht oder langsam dissoziierbarem Hormon beobachtet werden (Abbildung 9). Die Ursache dieses, verglichen mit Donner und Corin (76), anderen Verhaltens liegt vermutlich in der unterschiedlichen Ausführung der Dissoziation. Von Donner und Corin wurde die Dissoziation durch Verdünnen (1:200) mit insulinfreiem Puffer erreicht und wie die Assoziation bei 15°C durchgeführt. Hier wurde jedoch bei 28°C in Gegenwart von 100 nM nativem Insulin dissoziiert, um möglichst schnelle Dissoziation des ^{125}J-Insulins zu erreichen. Wenn das Modell von Donner und

Corin auch unter diesen Bedingungen gültig ist, so bedeutet dies, daß entweder aufgrund der höheren Temperatur oder der hohen Konzentration an nativem Insulin k_{-2} so groß oder größer als k_{-1} werden muß. Das Auftreten einer Rezeptorform R' hat dann unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Bedeutung. Die bei höheren Assoziationstemperaturen beobachtete zeitabhängige Akkumulation von nicht dissoziierbarem ^{125}J-Insulin (Abbildung 8) kann daher nur auf Internalisierung zurückgehen.

Allgemein wird angenommen, daß die Internalisierung durch adsorptive Pinocytose erreicht wird (122, 124, 183, 231, 249). Da dieser Endocytosemechanismus unterhalb von etwa 18°C nicht abläuft, ist das in Abbildung 9 gezeigte Verhalten, daß bei 16°C keine zeitabhängige Akkumulation von nicht dissoziierbarem ^{125}J-Insulin auftritt, zu erwarten. Der verbliebene Anteil von 5-10 %, der auch unter diesen Bedingungen nicht dissoziiert werden kann, ist vermutlich eine Folge der in der Dissoziationsphase (28-37°C) einsetzenden Internalisierung.

Auch von Kahn und Baird (166) wurden Dissoziationsversuche mit nativem Insulin zum Nachweis der Internalisierung von Insulin bei Fettzellen eingesetzt. Um sicherzustellen, daß der nichtdissoziierbare Anteil tatsächlich internalisiert worden ist, zerstörten sie gebundenes ^{125}J-Insulin zur Kontrolle außerdem durch Trypsin oder dissoziierten durch pH-Senkung (pH 6). Mit diesen Methoden erzielten sie qualitativ dieselben Ergebnisse.

5.3.2. Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes

Der Transport von Insulin ins Zellinnere auf dem Weg der adsorptiven Pinocytose oder rezeptorvermittelten Endocytose hat zur Folge, daß mit dem Hormon gleichzeitig auch der Rezeptor internalisiert wird. Dafür gibt es in der Literatur

eine Vielzahl indirekter (8, 71, 120, 198, 217, 272, 289, 311), aber nur wenige direkte Hinweise (21, 90, 123, 127). Die in Abbildung 33 gezeigten Autoradiographien erbringen einen direkten Nachweis für die Internalisierung des kovalenten Insulin-Rezeptor-Komplexes. Unmittelbar nach Photoaffinitätsmarkierung kann der Rezeptor auf der Zelloberfläche durch Trypsinverdauung zerstört werden, es resultiert eine Bande vom Molekulargewicht 150.000 (Abbildung 33 A, E). Wird die Trypsinverdauung jedoch erst nach Weiterinkubation der markierten Hepatocyten bei 37°C durchgeführt, so treten neben dieser Bande auch wieder die ursprünglichen Rezeptorbanden auf (Abbildung 33 C, D, F, G, H).

Mit diesen Experimenten lassen sich nur über den kovalenten ("artifiziellen") Insulin-Rezeptor-Komplex Aussagen machen, der nichtkovalente ("physiologische") Komplex scheint sich aber ebenso zu verhalten. Wie in Abbildung 28 gezeigt ist, induziert Insulin ein Anwachsen des intrazellulären Rezeptorpools auf das Doppelte. Dieser Befund ist ebenfalls als Nachweis der gemeinsamen Internalisierung mit Insulin zu werten. Bei diesen Versuchen ist aber nicht auszuschließen, daß gleichzeitig auch unbesetzte Rezeptoren internalisiert worden sind (vgl.5.4.).

Die Abbildung 33 zeigt, daß der Insulinrezeptor bei der Internalisierung keine Strukturänderung erfährt. Ferner ist zu erkennen, daß über den ganzen Zeitraum der Weiterinkubation etwa derselbe Anteil von Trypsin nicht erreicht werden kann (Abbildung 33 C). Dies kann bedeuten, daß nur ein bestimmter Teil der markierten Rezeptoren ins Zellinnere transportiert wird oder aber, daß Rezeptorrecycling zur Plasmamembran zu einem konstanten intrazellulären Rezeptorlevel führt (vgl. dazu 5.4.).

Von Fehlmann et al. (90) wurde nach Markierung mit einem anderen photoreaktiven Insulinderivat ebenfalls nachgewiesen, daß der kovalente Insulin-Rezeptor-Komplex von Hepatocyten internalisiert wird, wobei allerdings nur die redu-

zierten Rezeptorbanden untersucht wurden. Diese Autoren beobachteten, daß nach 2 Stunden bei 37°C praktisch die gesamte markierte Rezeptormenge nicht mehr trypsinverdaut werden kann. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen in Abbildung 33 C und erscheint wegen des Rezeptorrecyclings zur Plasmamembran (91) unwahrscheinlich (vgl. 5.4.). Mit der Methode der elektronenmikroskopischen Autoradiographie, mit der die Internalisierung von ^{125}J-Insulin nachgewiesen werden konnte (38, 120), wurde von Gorden et al. (123) ein weiterer direkter Nachweis der Internalisierung eines kovalenten Insulin-Rezeptor-Komplexes in Hepatocyten beschrieben. Auch für Fettzellen wurde Internalisierung eines kovalenten Insulin-Rezeptor-Komplexes (21) bzw. insulininduzierte Akkumulation von Rezeptoren im Zellinnern (127) nachgewiesen.

5.3.3. Mechanismus der Internalisierung

Über den Angriffsort verschiedener Inhibitoren wurde versucht, Hinweise auf den Internalisierungsmechanismus zu erhalten (131, 311, 323). Von den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen (Tabelle 4) konnte keine die Internalisierung beeinflussen. Die Internalisierung von Insulin scheint in Hepatocyten weder von einer Transglutaminase noch von einem funktionierenden Cytoskelett abzuhängen (vgl. 1.2.). Dagegen ergaben sich Hinweise darauf, daß Mikrotubuli am Rezeptorrecycling zur Plasmamembran beteiligt sind (vgl. 5.4.).

5.3.4. Intrazelluläre Rezeptoren

Insulinrezeptoren wurden in verschiedenen Kompartimenten von Zellen nachgewiesen (117, 269). Die Größenordnung der intrazellulären Rezeptoranteile in verschiedenen Geweben wurde von etwa 10 % (127, 219) bis 40 % (198) angegeben. Die eigene Bestimmung in Hepatocyten ergab, daß 15-20 % der Rezeptoren durch Trypsinverdauung nicht erreicht werden können (Abbildungen 28 und 34). Dieser Anteil wird als intrazellulär angesehen, wenn auch theoretisch denkbar ist, daß diese Rezeptoren trotzdem in der Plasmamembran, jedoch nicht an der Zelloberfläche sitzen.

Für die Bedeutung intrazellulärer Rezeptoren gibt es mehrere Möglichkeiten. Es ist wahrscheinlich, daß zur Beendigung des Insulinsignals der Hormon-Rezeptor-Komplex zu den Lysosomen transportiert wird, wo sich die Wege von Insulin und Rezeptor trennen (145, 199). Es wäre denkbar, daß intrazelluläre Rezeptoren der Vermittlung von Insulineffekten in den verschiedenen Zellkompartimenten dienen (317). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß es sich um neusynthetisierte Rezeptoren handelt, die durch Golgivesikel zur Plasmamembran transportiert werden können (18, 267). Zwischen intrazellulären Rezeptoren und Gesamtrezeptoren konnte kein Unterschied im Bindungsverhalten (65) (vgl. Abbildung 32) und in der Struktur (vgl. 4.5.2.) festgestellt werden. Wenn sich alle zellulären Rezeptoren gleichen, ergibt sich die Möglichkeit, daß der IRP durch den basalen Rezeptorturnover zwischen Plasmamembran und Zellinnerem entsteht (vgl. 5.4.). Der IRP könnte einen Rezeptorvorrat stellen, der es ermöglicht, den Rezeptorlevel der Zelloberfläche und damit die Insulinsensitivität zu regulieren. Das Anwachsen des IRP in Gegenwart von Insulin spricht für einen solchen Mechanismus (Abbildung 28, vgl. 5.4.).

Die genaue Charakterisierung von Endocytosevesikeln für α_2-Makroglobulin in Fibroblasten ergab, daß diese in ihren Eigenschaften von Lysosomen und Golgivesikeln zu unterscheiden sind. Williham und Pastan (334) nannten sie "Rezeptosomen", da sie eine Rolle bei der rezeptorvermittelten Endocytose spielen. Ihre Funktion soll dem Transport des Liganden zu den Lysosomen dienen, gleichzeitig sollen sie den lysosomalen Abbau der Rezeptoren verhindern. Ähnliche Vesikel mit Insulinrezeptoren wurden von Khan et al. (181) in Rattenleber charakterisiert. Dem Insulinrezeptor könnte damit eine Aufgabe beim intrazellulären Transport von Insulin zukommen.

5.4. Rezeptorregulation

5.4.1. Schicksal des internalisierten Rezeptors

Die Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes wirft die Frage nach dessen Schicksal in der Zelle auf. Der Verbleib des Liganden wurde bereits in 5.1.2. diskutiert. Für das akute Schicksal des Rezeptors sind folgende Wege denkbar:

i) Inaktivierung
ii) Abbau
iii) Recycling zur Plasmamembran

Inaktivierung und Abbau sind insofern unterschiedlich zu bewerten, als erstere im Gegensatz zum Abbau des Rezeptors seine Reaktivierung zulassen würde, womit ein Mechanismus zur Regulation des Rezeptorlevels zur Verfügung stünde. Es ist allerdings schwierig, die beiden Möglichkeiten experimentell zu unterscheiden.

Im einfachsten Fall könnte Inaktivierung bedeuten, daß die Rezeptoren so in die Plasmamembran eingelagert werden, daß

ihre Bindungsstellen von Insulin nicht mehr erreicht werden können. Der umgekehrte Vorgang, die insulininduzierte Aktivierung von "verborgenen" Bindungsstellen ("Up-Regulation") wurde von Corin und Donner (46) in Plasmamembranen aus Rattenleber nachgewiesen. In eigenen Versuchen mit Lebermembranen konnte keine erhöhte Bindung von ^{125}J-Insulin nach Vorinkubation mit nativem Insulin beobachtet werden. Dabei ist allerdings zu beachten, daß die hier verwendeten mikrosomalen Membranen möglicherweise andere Eigenschaften haben als die von Corin und Donner verwendeten Plasmamembranen. Wie in Abschnitt 4.10. gezeigt ist, kann der durch Insulin erreichte erhöhte Rezeptorlevel nicht durch Up-Regulation, sondern nur durch eine Inhibierung des Rezeptorabbaus (s.u.) erklärt werden. In dieser Arbeit konnte kein Hinweis auf einen Aktivierungs-Inaktivierungs-Mechanismus für den Insulinrezeptor erhalten werden, ein solcher Mechanismus kann aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Der Abbau des Rezeptors nach seiner Internalisierung erscheint unwahrscheinlich, da unter Bedingungen mit Internalisierung steady state Bindungen von ^{125}J-Insulin gemessen werden können (312). Die abgebauten Rezeptoren könnten durch de novo Synthese wegen des großen Insulinturnovers und damit Rezeptorturnovers (vorausgesetzt, Insulin und Rezeptor werden stöchiometrisch internalisiert) nicht ersetzt werden (312). Außerdem hatte Cycloheximid als Inhibitor der Proteinsynthese keinen Einfluß auf die Rezeptorkonzentration auf der Zelloberfläche (219, 312). Ein Ersatz aus einem vorhandenen Rezeptorvorrat wäre ebenfalls denkbar. Diese Möglichkeit scheidet jedoch aus, da im IRP nur 15-20 % des gesamten Rezeptorvorrates gefunden werden konnten (Abbildungen 28 und 34).

In Abbildung 34 ist gezeigt, daß während Inkubation bei 37°C sowohl GRP als auch IRP abnehmen. Diese als Rezeptorabbau zu wertende Beobachtung ist jedoch nicht insulininduziert. Dieser Abbau erscheint vielmehr als Folge der negativen Proteinbilanz frisch isolierter Hepatocyten (295, 297). Die

Inhibierung dieses Abbaus durch Insulin wird dann aufgrund seiner anabolen Eigenschaften verständlich (79, 147, 263, 280). Da bei 16°C kein Rezeptorabbau nachgewiesen werden konnte (Abbildung 36), findet er wohl intrazellulär statt und ist von einer Endocytose (Autophagocytose) abhängig (147, 235).

Da während zweistündiger Inkubation von Hepatocyten mit Insulin der GRP nur wenig, insbesondere wenig im Vergleich zur Kontrolle ohne Insulin, abnimmt (Abbildung 40), ist auszuschließen, daß die Rezeptoren nach insulininduzierter Internalisierung abgebaut werden. Auch für den photoaffinitätsmarkierten Insulin-Rezeptor-Komplex konnte in Übereinstimmung mit anderen Autoren (91, 146) kein Abbau nachgewiesen werden (Abbildung 33).

Durch in vivo Markierung mit "schweren" Aminosäuren (^{15}N-, ^{13}C- und ^{2}H-markiert) konnten neusynthetisierte von bereits vorhandenen Rezeptoren unterschieden werden. Mit dieser "density shift" Methode konnten Krupp und Lane (198) zeigen, daß trotz Down Regulation (vgl. 1.2.) in kultivierten Leberzellen aus Küken weder Synthese- noch Abbauraten des Rezeptors verändert wurden. In anderen Geweben konnte dagegen mit derselben und anderen Methoden eine insulininduzierte Erhöhung der Rezeptorabbaurate nachgewiesen werden (173, 188, 196, 278, 282). Green und Olefsky (127) und Berhanu et al.(21) zeigten ebenfalls, daß in Rattenfettzellen internalisierte Insulinrezeptoren teilweise abgebaut werden. Auch für kovalenten EGF-Rezeptor-Komplex konnte nachgewiesen werden, daß er in 3T3-Zellen lysosomal abgebaut wird (59, 94). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß es gewebespezifische Unterschiede bei der intrazellulären Verarbeitung von Rezeptoren gibt.

Aufgrund der Beobachtung, daß trotz Internalisierung von Insulin in Fettzellen (219) und anderen Liganden in verschiedenen Zelltypen (4, 119, 170, 302, 308, 316) die Rezeptorkonzentration auf der Zelloberfläche konstant bleibt,

wurde Rezeptorrecycling postuliert. Auch für andere Membranbestandteile wurde nach Endocytose deren Recycling zur Zelloberfläche gezeigt (290). Fehlmann et al. (91) konnten über die Trypsinsensitivität von photoaffinitätsmarkierten Insulinrezeptoren auch in Hepatocyten Rezeptorrecycling nachweisen. Der Befund der vorliegenden Arbeit, daß der IRP in Gegenwart von Insulin nach anfänglich schnellem Anstieg konstant bleibt, ohne daß insulininduzierter Rezeptorabbau nachgewiesen werden konnte, stützt diese Recyclinghypothese (Abbildung 28).

Der schnelle Anstieg des IRP durch Insulin führt zu einer Neuverteilung der Insulinrezeptoren zwischen Zelloberfläche und intrazellulären Kompartimenten. Auch mit photoaffinitätsmarkierten Rezeptoren ist das Erreichen einer neuen (konstanten) Rezeptorverteilung zu erkennen (Abbildung 33 C). Die Rezeptorverteilung, die über Internalisierung und Recycling reguliert werden kann, könnte die Insulinsensitivität beeinflussen und/oder der Vermittlung von Insulineffekten dienen. Der hier beschriebene akute Insulineffekt muß von der Down Regulation, die einen chronischen Insulineffekt darstellt (vgl. 1.2.), unterschieden werden.

5.4.2. Effekt von Colchicin

An der intrazellulären Translokation von endocytotischen Vesikeln in Hepatocyten sind vermutlich Mikrotubuli beteiligt (144, 195, 238). Ebenso laufen andere intrazelluläre Transportvorgänge wie Proteinsekretion (275) oder Translokation von Lysosomen (234) unter deren Mitwirkung ab. Diese Ergebnisse wurden durch die Inhibierung dieser Vorgänge nach Zerstörung von Mikrotubuli mit Colchicin gewonnen. Durch Versuche mit Colchicin konnten auch einige Hinweise auf das intrazelluläre Schicksal des internalisierten Insulinrezeptors erhalten werden.

Whittaker et al. (332) untersuchten, inwieweit die Mikrotubuli eine Rolle beim Turnover der Insulinrezeptoren spielen. Sie fanden bei Inkubation von Hepatocyten mit Insulin und Colchicin eine Abnahme der Rezeptorkonzentration auf der Zelloberfläche verglichen mit einer Kontrolle ohne Colchicin. Sie interpretierten diesen Effekt mit einer Störung des Rezeptorrecycling zur Plasmamembran. Terris et al. (311) berichteten, daß Colchicin zwar nicht die Insulinbindung, jedoch den rezeptorvermittelten (intrazellulären) Insulinabbau in Hepatocyten inhibiert. Diese Autoren vermuten, daß Colchicin entweder die Internalisierung von Insulin inhibiert oder mit dem Transport der internalisierten Membranvesikel bzw. deren Fusion mit den Lysosomen interferiert. Ähnliche Hinweise ergaben sich aus den Ergebnissen von Varandani et al. (323), die eine Inhibierung verschiedener Langzeiteffekte von Insulin durch Colchicin beobachteten und dies ebenfalls auf eine Störung des lysosomalen Insulinabbaus zurückführten. Durch Experimente in vivo zeigten Posner et al. (270), daß die Aufnahme von Insulin in Golgifraktionen der Rattenleber durch Colchicin gestört wird.

Durch die in 4.8.2. gezeigte Untersuchung des IRP konnte direkt beobachtet werden, daß Colchicin in Gegenwart von Insulin zu einer Akkumulation von Insulinrezeptoren im Zellinnern führt (Abbildung 28). Colchicin kann also nicht die Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes inhibieren, sondern stört tatsächlich den intrazellulären Transfer des Rezeptors.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, führte Colchicin auch in Abwesenheit von Insulin zu einer langsamen Rezeptorakkumulation im Zellinnern (187), während Whittaker et al. (332) in Abwesenheit von Insulin keinen Colchicineffekt demonstrieren konnten. Die Gründe für diese unterschiedlichen Ergebnisse sind unklar. Der hier gezeigte Colchicineffekt ist maximal zwischen 10^{-5} und 10^{-3} M (Abbildung 30). Seine starke Abschwächung bei 16°C legt nahe, daß er mit der Internalisierung des Rezeptors in Zusammenhang steht. In der

Tat kann die intrazelluläre Rezeptorakkumulation nur dadurch erklärt werden, daß auch ohne Insulinbindung Rezeptoren internalisiert werden (187), d.h. ein basaler Rezeptorturnover stattfindet. Da zur Trypsinverdauung die Zellen 10 Minuten bei 37°C inkubiert werden, ist während dieser Zeit Rezeptorinternalisierung möglich. Dies führt vermutlich dazu, daß auch nach Inkubation bei 16°C ein kleiner Colchicineffekt auftritt (Abbildung 30).

In einigen Geweben konnte gezeigt werden, daß auch in Abwesenheit von Liganden Internalisierung von Rezeptoren stattfindet (119, 182, 183, 195, 313, 316). Da dieser basale Rezeptorturnover für verschiedene Liganden gefunden wurde, ist anzunehmen, daß es sich dabei um einen allgemeinen Mechanismus handelt, dem bei der Rezeptorregulation Bedeutung zukommt.

Es stellt sich nun die Frage, wie der Effekt von Colchicin auf das Dissoziationsverhalten von zellassoziiertem ^{125}J-Insulin zu interpretieren ist. Der physiologische Weg von Insulin ist mit den drei Stationen Bindung an den Rezeptor, Internalisierung und lysosomaler Abbau zu beschreiben. Wenn also Assoziationskurven unter inhibiertem Insulinabbau (Bacitracin) aufgenommen werden, ist nach dieser Abfolge eine Akkumulation von ^{125}J-Insulin im Zellinnern zu erwarten, falls oberhalb von 18°C inkubiert wird. Wie die Abbildung 8 zeigt, ist dies tatsächlich der Fall, die abnehmende Dissoziierbarkeit kann als Indiz für Internalisierung gewertet werden (vgl. 5.3.1.). Nun ist in Gegenwart von 1 mM Colchicin diese Akkumulation verstärkt (Abbildung 20). Daraus kann man schließen, daß ohne Colchicin ein Teil des internalisierten Insulins durch das Rezeptorrecycling wieder "externalisiert" wird. Die vermehrte Akkumulation von ^{125}J-Insulin im Zellinnern ist eine Folge des durch Colchicin inhibierten Recyclings. Das Rezeptorrecycling scheint also nicht auf unbesetzte Rezeptoren beschränkt zu sein. Auch von Suzuki und Kono (305) wurde in Fettzellen Exocytose von internalisiertem Insulin beobachtet. Dies wird durch die Er-

gebnisse von Fehlmann et al. (91) bestätigt, die Recycling von kovalentem Insulin-Rezeptor-Komplex fanden.

Die Insulinakkumulation in Gegenwart von Colchicin ließe sich auch durch Inhibierung des intrazellulären Insulinabbaus, der bei 37°C trotz Bacitracin stattfindet, erklären. Dagegen spricht, daß 1 mM Colchicin den Insulinabbau nur in geringem Ausmaß inhibiert (vgl. Abbildung 23). Außerdem führt Colchicin auch bei 23°C zur Insulinakkumulation in Hepatocyten. Bei dieser Temperatur ist jedoch jeglicher Insulinabbau durch Bacitracin inhibiert (vgl. Abbildung 11 D).

5.4.3. Rezeptorturnover

Modelle des Rezeptorturnovers, wie sie von verschiedenen Autoren aufgestellt wurden, haben weitgehend hypothetischen Charakter (119, 124, 160, 203, 269). Es sind nicht alle einzelnen Schritte hinreichend nachgewiesen und über deren Mechanismus ist teilweise nur wenig bekannt. Die Eigenschaften der Endocytosevesikel (coated oder uncoated vesicles?) und deren intrazellulärer Weg sind noch umstritten. Nachfolgend sind einige Charakteristika für den Turnover des Insulinrezeptors in Hepatocyten zusammengestellt, wie sie sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung von Ergebnissen aus der Literatur darstellen.

i) Insulin wird samt Rezeptor durch adsorptive Pinocytose internalisiert.
ii) Der internalisierte Rezeptor wird zur Plasmamembran zurücktransportiert (Recycling), während Insulin lysosomal abgebaut wird.
iii) Ein basaler Rezeptorturnover findet auch ohne Bindung von Insulin statt.
iv) Recycling zur Plasmamembran ist auch mit besetzten Insulinrezeptoren möglich.

v) Am Recycling, evtl. am gesamten intrazellulären Transport der Rezeptoren, sind Mikrotubuli beteiligt.

vi) Der Rezeptorturnover (Internalisierung, Recycling) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Rezeptorkonzentration in der Plasmamembran.

6. ZUSAMMENFASSUNG

In isolierten Rattenhepatocyten wurde die Struktur des Insulinrezeptors nach Photoaffinitätsmarkierung mit ^{125}J-MABI untersucht. Die Bindung des photolabilen Insulinderivats wurde bei 16°C in Gegenwart von Bacitracin als Inhibitor des Insulinabbaus vorgenommen. Diese Bedingungen erlaubten die höchsten spezifischen Bindungen an den hochaffinen Rezeptor (K_D ca. 0,25 nM) der Plasmamembran. Der markierte Rezeptor wurde mit Triton-X-100 aus den Hepatocyten extrahiert und über Sepharose CL 6B gelfiltriert, wobei ein spezifischer Rezeptorpeak gefunden wurde. Durch SDS-PAGE nach Laemmli konnten ohne Reduktion der Proben vier Rezeptorbanden vom Molekulargewicht 290.000 bis 390.000 aufgelöst werden. Zwischen den Banden werden enge strukturelle Beziehungen vermutet. Nach Reduktion blieben zwei Rezeptorbanden mit Molekulargewicht 115.000 und 130.000 übrig.

Die Internalisierung von Insulin wurde durch die zeitabhängige Abnahme der Dissoziierbarkeit von zellgebundenem ^{125}J-Insulin nachgewiesen. Bei 16°C waren im Gegensatz zu Temperaturen von 23°C und höher über 90 % des ^{125}J-Insulins reversibel gebunden, d.h. bei dieser Temperatur war die Internalisierung inhibiert. Es wurde versucht, die Internalisierung durch Einsatz von Agenzien, die die Funktion des Cytoskeletts stören, oder von Transglutaminaseinhibitoren zu inhibieren. Von den untersuchten Substanzen war keine als Internalisierungsinhibitor geeignet. Colchicin verstärkte sogar die Akkumulation von nicht dissoziierbarem ^{125}J-Insulin in der Zelle.

Da die Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors bei 16°C durchgeführt wurde, konnten die Rezeptoren ausschließlich der Plasmamembran markiert werden. Durch Inkubation der Hepatocyten nach der Markierung bei 37°C konnte die Translokation des kovalenten Insulin-Rezeptor-Komplexes ins

Zellinnere direkt nachgewiesen werden. Unmittelbar nach Ende der Markierung, also ohne Inkubation bei 37°C, ließen sich alle markierten Rezeptoren durch Trypsin zerstören. Nach Inkubation bei 37°C konnte nur noch ein Teil zerstört werden, da die internalisierten Rezeptoren der Trypsinverdauung nicht mehr zugänglich waren.

Durch Extraktion der Insulinrezeptoren mit Triton-X-100 nach Trypsinverdauung der Plasmamembranrezeptoren wurde festgestellt, daß 15-20 % der Rezeptoren intrazellulär vorliegen. Diese intrazellulären Rezeptoren zeigten, verglichen mit den Plasmamembranrezeptoren, keinen Unterschied in der Struktur und im Bindungsverhalten. Für den intrazellulären Rezeptorpool konnte ein insulininduziertes Anwachsen nachgewiesen werden, wie es durch Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes zu erwarten ist.

Der intrazelluläre Rezeptoranteil behielt nach schnellem Anstieg in Gegenwart von Insulin auch bei längerer Inkubation (bis zu zwei Stunden) mit Insulin einen konstanten Wert von 30-35 %. Da kein insulininduzierter Rezeptorabbau gefunden wurde, kann der konstante intrazelluläre Rezeptorlevel nur durch Recycling internalisierter Rezeptoren zur Plasmamembran erklärt werden. Colchicin führte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Insulin zu einer Akkumulation von Rezeptoren im Zellinnern, die mit einer Störung des Rezeptorrecyclings zu erklären ist. Der Colchicineffekt in Abwesenheit von Insulin weist auf einen basalen Rezeptorturnover hin. Da Colchicin auch eine Akkumulation von ^{125}J-Insulin bewirkte, wird vermutet, daß das Rezeptorrecycling nicht auf unbesetzte Rezeptoren beschränkt ist.

Aus den gesammelten Informationen ergibt sich folgendes Bild vom Rezeptorturnover in Hepatocyten. Nach Bindung von Insulin wird der Insulin-Rezeptor-Komplex internalisiert und Insulin intrazellulär abgebaut. Der Rezeptor wird zur Plasmamembran zurücktransportiert. Auch nicht mit Insulin besetzte Rezeptoren können internalisiert werden, ebenso ist

Recycling zur Plasmamembran mit besetzten Rezeptoren möglich. Durch Internalisierung und Recycling kann die zelluläre Rezeptorverteilung verändert werden, der Zelle steht damit ein Mechanismus zur Regulation der Insulinsensitivität zur Verfügung.

7. L I T E R A T U R

1. Africa, B., Carpenter, F.H. (1970) Biochemistry 9, 1962-1972

2. Ahmed, C.E., Niswender, G.D. (1981) Endocrinology 109, 1388-1393

3. Amatruda, J.M., Finch, E.D. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2619-2625

4. Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L., Brown, M.S. (1977) Nature 270, 695-699

5. Assoian, R.K., Tager, H.S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4042-4049

6. Baker, J.B., Simmer, R.L., Glenn, K.C., Cunningham, D.D. (1979) Nature 278, 743-745

7. Baldwin, D., Jr., Terris, S., Steiner, D.F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4028-2034

8. Baldwin, D., Jr., Prince, M., Marshall, S., Davies, P., Olefsky, J.M. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5975-5978

9. Baldwin, D., Jr., Prince, M., Tsai, P., Johnson, C., Lotan, R., Rubenstein, A.H., Olefsky, J.M. (1981) Am. J. Physiol. 241, E251-E260

10. Bar, R.S., Gorden, P., Roth, J., Kahn, C.R., De Meyts, P. (1976) J. Clin. Invest. 58, 1123-1135

11. Bar, R.S., Hoak, J.C., Peacock, M.L. (1978) J. Clin. Endocrinol. Metab. 47, 699-702

12. Barazzone, P., Carpentier, J.-L., Gorden, P., Van Obberghen, E., Orci, L. (1980) Nature 286, 401-403

13. Barazzone, P., Lesniak, M.A., Gorden, P., Van Obberghen, E., Carpentier, J.-L., Orci, L. (1980) J. Cell Biol. 87, 360-369

14. Baron, M.D., Wisher, M.H., Thamm, P.M., Saunders, D.J., Brandenburg, D., Sönksen, P.H. (1981) Biochemistry 20, 4156-4161

15. Baron, M.D., Sönksen, P.H. (1983) Biochem. J. 212, 79-84

16. Bayley, H., Knowles, J.R. (1977) Methods Enzymol. 46, 69-114

17. Beck-Nielsen, H., Pedersen, O., Kragballe, K., Schwartz Sørensen, N. (1977) Diabetologia 13, 563-569

18. Bergeron, J.J.M., Evans, W.H., Geschwind, I.I. (1973) J. Cell Biol. 59, 771-776

19. Bergeron, J.J.M., Posner, B.I., Josefsberg, Z., Sikstrom, R. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4058-4066

20. Bergeron, J.J.M., Sikstrom, R., Hand, A.R., Posner, B.I. (1979) J. Cell Biol. 80, 427-443

21. Berhanu, P., Olefsky, J.M., Tsai, P., Thamm, P., Saunders, D., Brandenburg, D. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 4069-4073

22. Berry, M.N., Friend, D.S. (1969) J. Cell Biol. 43, 506-520

23. Blackard, W.G., Guzelian, P.S., Small, M.E. (1978) Endocrinology 103, 548-553

24. Borisy, G.G., Taylor, E.W. (1967) J. Cell Biol. 34, 525-533

25. Bray, D. (1979) Nature 282, 671

26. Bretscher, M.S. (1976) Nature 260, 21-23

27. Brown, S.S., Spudich, J.A. (1981) J. Cell Biol. 88, 487-491

28. Brush, J.S. (1971) Diabetes 20, 140-145

29. Burghen, G.A., Kitabchi, A.E., Brush, J.S. (1972) Endocrinology 91, 633-642

30. Capeau, J., Picard, J., Caron, M. (1978) Cancer Res. 38, 3930-3937

31. Capeau, J., Picard, J. (1980) FEBS Letters 118, 25-30

32. Caro, J.F., Amatruda, J.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10052-10055

33. Caro, J.F., Amatruda, J.M. (1980) Science 210, 1029-1031

34. Caron, M., Picard, J., Kern, P. (1978) Biochim. Biophys. Acta 512, 29-40

35. Carpenter, G., Cohen, S. (1976) J. Cell Biol. 71, 159-171

36. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Le Cam, A., Freychet, P., Orci, L. (1977) Diabetologia 13, 386

37. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Amherdt, M., Van Obberghen, E., Kahn, C.R., Orci, L. (1978) J. Clin. Invest. 61, 1057-1070

38. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Freychet, P., Le Cam, A., Orci, L. (1979) J. Clin. Invest. 63, 1249-1261

39. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Barazzone, P., Freychet, P., Le Cam, A., Orci, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2803-2807

40. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Freychet, P., Le Cam, A., Orci, L. (1979) Experientia 35, 904-906

41. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Freychet, P., Le Cam, A., Orci, L. (1979) Diabetologia 17, 379-384

42. Carpentier, J.-L., Van Obberghen, E., Gorden, P., Orci, L. (1981) Exp. Cell Res. 134, 81-92

43. Chang, K.-J., Bennett, V., Cuatrecasas, P. (1975) J. Biol. Chem. 250, 488-500

44. Chowdhry, V., Westheimer, F.H. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 293-325

45. Clark, S., Harrison, L.C. (1982) J. Biol. Chem. 257, 12239-12244

46. Corin, R.E., Donner, D.B. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11413-11416

47. Corin, R.E., Donner, D.B. (1982) J. Biol. Chem. 257, 104-110

48. Corin, R.E., Donner, D.B. (1982) Biochem. J. 202, 259-262

49. Creasay, W.A. (1979) in "Antibiotics, Mechanism of Action of Antieukaryotic and Antiviral Compounds" (F.E. Hahn, ed.) Vol. V/2, 414-438, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

50. Cuatrecasas, P., Desbuquois, B., Krug, F. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 333-339

51. Cuatrecasas, P. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1264-1268

52. Cuatrecasas, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 318-322

53. Cuatrecasas, P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1980-1991

54. Cuatrecasas, P., Tell, G.P.E. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 485-489

55. Cuatrecasas, P. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3528-3534

56. Czech, M.P. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 359-384

57. Czech, M.P., Massague, J., Pilch, P.F. (1981) Trends Biochem. Sci. 6, 222-225

58. Czech, M.P. (1981) Am. J. Med. 70, 142-150

59. Das, M., Fox, C.F. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2644-2648

60. Das, M., Fox, D.F. (1979) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 8, 165-193

61. Davidson, M.B., Frank, H.J.L. (1981) in "Current Views on Insulin Receptors" (Andreani, D., De Pirro, R., Lauro, R., Olefsky, J.M., Roth, J., eds.) Serono Symposia Vol. 41, 295-301, Academic Press, London, New York

62. Davidson, M.B., Venkatesan, N. (1983) Metabolism 31, 1206-1209

63. Davies, P.J.A., Davies, D.R., Levitzki, A., Maxfield, F.R., Milhaud, P., Willingham, M.C., Pastan, I.H. (1980) Nature 283, 162-167

64. Deger, A., Koch, R., Klotz, K.-N., Jäck, H.-M., Müller, G., Rapp, R., Weber, U. (1983) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1114-1115

65. Deger, A. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen

66. De Meyts, P., Roth, J., Neville, D.M., Jr., Gavin, J.R., III, Lesniak, M.A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 164-161

67. De Meyts, P., Gavin, J.R., III, Roth, J., Neville, D.M., Jr. (1974) Diabetes 23 (Suppl. 1) 355

68. De Meyts, P., Bianco, A.R., Roth, J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1877-1888

69. Denton, R.M., Brownsey, R.W., Belsham, G.J. (1981) Diabetologia 21, 347-362

70. De Petris, S. (1974) Nature 250, 54-56

71. Desbuquois, B., Willeput, J., Huet de Froberville, A. (1979) FEBS Letters 106, 338-344

72. Dolais-Kitabgi, J., Checler, F., Rey, J.-F., Morin, O., Freychet, P. (1981) FEBS Letters 128, 321-324

73. Donner, D.B., Martin, D.W., Sonenberg, M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 672-676

74. Donner, D.B.(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3176-3180

75. Donner, D.B. (1980) Biochemistry 19, 3300-3306

76. Donner, D.B., Corin, R.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9005-9008

77. Donner, D.B. (1982) Biochem. J. 208, 211-219

78. Draznin, B., Solomons, C.C., Toothaker, D.R., Sussman, K.E. (1981) Endocrinology 108, 8-17

79. Draznin, B., Trowbridge, M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 11988-11993

80. Duckworth, W.C., Heinemann, M.A., Kitabchi, A.E. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3698-3702

81. Duckworth, W.C. (1979) Endocrinology 104, 1758-1764

82. Duckworth, W.C., Runyan, K.R., Wright, R.K., Halban, P.A., Solomon, S.S. (1981) Endocrinology 108, 1142-1147

83. Dwenger, A., Tost, P., Trautschold, I. (1982) Fresenius Z. Anal. Chem. 311, 471-472

84. Eckel, J., Reinauer, H. (1980) Biochim. Biophys. Acta 629, 510-521

85. Elbein, A.D. (1981) Trends Biochem. Sci. 6, 219-221

86. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971) Biochemistry 10, 2606-2617

87. Fan, J.Y., Carpentier, J.-L., Gorden, P., Van Obberghen, E., Blackett, N.M., Grunfeld, C., Orci, L. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7788-7791

88. Fehlmann, M., Morin, O., Kitabgi, P., Freychet, P. (1981) Endocrinology 109, 253-261

89. Fehlmann, M., Le Marchand-Brustel, Y., Van Obberghen, E., Brandenburg, D., Freychet, P. (1982) Diabetologia 23, 440-444

90. Fehlmann, M., Carpentier, J.-L., Le Cam, A., Thamm, P., Saunders, D., Brandenburg, D., Orci, L., Freychet, P. (1982) J. Cell Biol. 93, 82-87

91. Fehlmann, M., Carpentier, J.-L., Van Obberghen, E., Freychet, P., Thamm, P., Saunders, D., Brandenburg, D., Orci, L.(1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5921-5925

92. Finn, F.M., Titus, G., Nemoto, H., Noji, T., Hofmann, K. (1982) Metabolism 31, 691-698

93. Flier, J.S., Kahn, C.R., Roth, J., Bar, R.S. (1975) Science 190, 63-65

94. Fox, C.F., Das, M. (1979) J. Supramol. Struct. 10, 199-214

95. Frank, H.J.L., Davidson, M.B. (1981) in "Current Views on Insulin Receptors" (Andreani, D., De Pirro, R., Lauro, R., Olefsky, J.M., Roth, J., eds.) Serono Symposia Vol. 41, 151-157, Academic Press, London, New York

96. Frank, R.N., Rodbard, D. (1975) Arch. Biochem. Biophys. 171, 1-13

97. Freedman, R.B. (1979) Trends Biochem. Sci. 4, 193-197

98. Freychet, P., Roth, J., Neville, D.M., Jr. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 400-408

99. Freychet, P., Kahn, R., Roth, J., Neville, D.M., Jr. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3953-3961

100. Galardy, R.E., Craig, L.C., Jamieson, J.D., Printz, M.P. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3510-3518

101. Gambhir, K.K., Archer, J.A., Bradley, C.J. (1978) Diabetes 27, 701-708

102. Gammeltoft, S., Gliemann, J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 320, 16-32

103. Gammeltoft, S., Kristensen, L.Ø., Sestoft, L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8406-8413

104. Gavin, J.R., III, Gorden, P., Roth, J., Archer, J.A., Buell, D.N. (1973) J. Biol. Chem. 248, 2202-2207

105. Gavin, J.R., III, Roth, J., Neville, D.M., Jr., De Meyts, P., Buell, D.N. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 84-88

106. Geisow, M. (1980) Nature 288, 434-436

107. Ginsberg, B.H., Kahn, C.R., Roth, J., De Meyts, P. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 1068-1074

108. Ginsberg, B.H., Cohen, R.M., Kahn, C.R., Roth, J. (1978) Biochim. Biophys. Acta 542, 88-100

109. Ginsberg, B.H., Brown, T.J., Simon, I., Spector, A.A. (1981) Diabetes 30, 773-780

110. Gliemann, J., Sonne, O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7857-7863

111. Goidl, J.A. (1979) Biochemistry 18, 3674-3679

112. Goldfine, I.D., Gardner, J.D., Neville, D.M., Jr. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6919-6926

113. Goldfine, I.D., Smith, G.J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1427-1431

114. Goldfine, I.D. (1977) Diabetes 26, 148-155

115. Goldfine, I.D., Smith, G.J., Wong, K.Y., Jones, A.L. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1368-1372

116. Goldfine, I.D., Jones, A.L., Hradek, G.T., Wong, K.Y., Mooney, J.S. (1978) Science 202, 760-763

117. Goldfine, I.D. (1981) Biochim. Biophys. Acta 650, 63-67

118. Goldfine, I.D., Purello, F., Clawson, G.A., Vigneri, R. (1982) J. Cell. Biochem. 20, 29-39

119. Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., Brown, M.S. (1979) Nature 279, 679-685

120. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Freychet, P., Le Cam, A., Orci, L. (1978) Science 200, 782-785

121. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Cohen, S., Orci, L. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5025-5029

122. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Freychet, P., Orci, L. (1980) Diabetologia 18, 263-274

123. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Moule, M.L., Yip, C.C., Orci, L. (1982) Diabetes 31, 659-662

124. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Fan, J.-Y., Orci, L. (1982) Metabolism 31, 664-669

125. Gould, R.J., Ginsberg, B.H., Spector, A.A. (1981) Biochemistry 20, 6776-6781

126. Gould, R.J., Ginsberg, B.H., Spector, A.A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 477-484

127. Green, A., Olefsky, J.M. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 427-431

128. Grinde, B., Seglen, P.O. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 549-556

129. Haigler, H.T., Ash, J.F., Singer, S.J., Cohen, S. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3317-3321

130. Haigler, H.T., Maxfield, F.R., Willingham, M.C., Pastan, I. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1239-1241

131. Haigler, H.T., Willingham, M.C., Pastan, I. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 630-637

132. Hammond, J.M., Jarett, L. (1975) Diabetes 24, 1011-1019

133. Hammons, G.T., Jarett, L. (1980) Diabetes 29, 475-486

134. Hammons, G.T., Smith, R.M., Jarett, L. (1982) J. Biol. Chem. 257, 11563-11570

135. Harmon, J.T., Kahn, C.R., Kempner, E.S., Schlegel, W. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3412-3419

136. Harrison, L.C., Billington, T., East, I.J., Nichols, R.J., Clark, S. (1978) Endocrinology 102, 1485-1495

137. Harrison, L.C., Itin, A. (1980) J. Biol. Chem. 255, 12066-12072

138. Harrison, L.C., Itin, A., Kasuga, M., Van Obberghen, E. (1982) Diabetologia 22, 233-238

139. Hedo, J.A., Harrison, L.C., Roth, J. (1981) Biochemistry 20, 3385-3393

140. Hedo, J.A., Kasuga, M., Van Obberghen, E., Roth, J. Kahn, C.R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4791-4795

141. Heinrich, J., Pilch, P.F., Czech, M.P. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1732-1737

142. Herzberg, V., Boughter, J.M., Carlisle, S., Hill, D.E. (1980) Nature 286, 279-281

143. Heuser, J. (1980) J. Cell Biol. 84, 560-583

144. Hoffstein, S., Goldstein, I.M., Weissman, G. (1977) J. Cell Biol. 73, 242-256

145. Hofmann, C., Marsh, J.W., Miller, B., Steiner, D.F. (1980) Diabetes 29, 856-874

146. Hofmann, C., Ji, T.H., Miller, B., Steiner, D.F. (1981) J. Supramol. Struct. Cell. Biochem. 15, 1-13

147. Hopgood, M.F., Clark, M.G., Ballard, F.J. (1980) Biochem. J. 186, 71-79

148. Horvat, A., Li, E., Katsoyannis, P.G. (1975) Biochim. Biophys. Acta 382, 609-620

149. Horvat, A. (1978) J. Cell. Physiol. 97, 37-48

150. Hunter, W.M., Greenwood, F.C. (1962) Nature 194, 495-496

151. Ingebretsen, W.R., Jr., Wagle, S.R. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 403-410

152. Izzo, J.L., Roncone, A.M., Helton, D.L., Izzo, M.J. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 198, 97-109

153. Jacobs, S., Cuatrecasas, P. (1976) Biochim. Biophys. Acta 433, 482-495

154. Jacobs, S., Shechter, Y., Bissell, K., Cuatracasas, P. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77, 981-988

155. Jacobs, S., Cuatrecasas, P. (1977) Trends Biochem. Sci. 2, 280-282

156. Jacobs, S., Chang, K.-J., Cuatrecasas, P. (1978) Science 200, 1283-1284

157. Jacobs, S., Hazum, E., Shechter, Y., Cuatrecasas, P. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4918-4921

158. Jacobs, S., Hazum, E., Cuatrecasas, P. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 1066-1073

159. Jacobs, S., Hazum, E., Cuatrecasas, P. (1980) J. Biol. Chem. 255, 6937-6940

160. Jacobs, S., Cuatrecasas, P. (1983) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 461-479

161. Jäck, H.-M. (1984) Diplomarbeit, Universität Tübingen

162. Jeffrey, P.D. (1982) Diabetologia 23, 381-385

163. Ji, T.H. (1979) Biochim. Biophys. Acta 559, 39-69

164. Kahn, C.R., Freychet, P., Roth, J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2249-2257

165. Kahn, C.R. (1976) J. Cell Biol. 70, 261-286

166. Kahn, C.R., Baird, K. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4900-4906

167. Kahn, C.R., Baird, K., Jarrett, D.B., Flier, J.S. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 4209-4213

168. Kahn, C.R. (1980) Metabolism 29, 455-466

169. Kaplan, J., Nielsen, M.L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7329-7335

170. Kaplan, J. (1980) Cell 19, 197-205

171. Kasuga, M., Tsushima, T., Akanuma, Y., Kosaka, K. (1979) Diabetologia 17, 311-318

172. Kasuga, M., Van Obberghen, E., Yamada, K.M., Harrison, L.C. (1981) Diabetes 30, 354-357

173. Kasuga, M., Kahn, C.R., Hedo, J.A., Van Obberghen, E., Yamada, K.M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6917-6921

174. Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, D.L., Kahn, C.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2137-2141

175. Kato, S., Nakamura, T., Ichihara, A. (1982) J. Biochem. 92, 699-708

176. Katzen, H.M., Soderman, D.D., Green, B.G. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 410-416

177. Keilacker, H., Ziegler, M., Knospe, S., Ziegler, B., Besch, W. (1978) Acta Biol. Med. Germ. 37, 601-611

178. Kelm, S. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen

179. Kelm, S., Koch, R., Weber, U. (1983) in "2nd International Symposium on Insulin Receptors, Receptor Interaction and Insulin Action", Abstracts of Reports (De Pirro, R., ed.) 18

180. Kemmler, W., Renner, R., Zynamon, A., Hepp, K.D. (1978) Biochim. Biophys. Acta 543, 349-356

181. Khan, M.N., Posner, B.I., Verma, A.K., Khan, R.J., Bergeron, J.J.M. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4980-4984

182. King, A.C., Hernaez-Davis, L., Cuatrecasas, P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3283-3287

183. King, A.C., Cuatrecasas, P. (1981) New Engl. J. Med. 305, 77-88

184. Klotz, I.M., Hunston, D.L. (1971) Biochemistry 10, 3065-3069

185. Klotz, I.M. (1982) Science 217, 1247-1249

186. Klotz, K.-N. (1979) Diplomarbeit, Universität Tübingen

187. Klotz, K.-N., Koch, R., Weber, U. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 344

188. Knutson, V.P., Ronnett, G.V., Lane, M.D. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2822-2826

189. Koch, R. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen

190. Koch, R., Weber, U. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 347-351

191. Koch, R. (1981) Dissertation, Universität Tübingen

192. Koch, R., Klotz, K.-N., Kelm, S., Deger, A., Jäck, H.-M., Weber, U. (1983) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 345

193. Koch, R., Kelm, S., Weber, U. (1983) in "2nd International Symposium on Insulin Receptors, Receptor Interaction and Insulin Action", Abstracts of Reports (de Pirro, R., ed.) 17

194. Koch, R. (1983) Persönliche Mitteilung

195. Kolset, S.O., Tolleshaug, H., Berg, T. (1979) Exp. Cell Res. 122, 159-167

196. Kosmakos, F.C., Roth, J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9860-9869

197. Krupp, M.N., Livingston, J.N. (1980) Endocrinology 106, 179-184

198. Krupp, M.N., Lane, M.D. (1981) J. Biol. Chem. 256, 1689-1694

199. Krupp, M.N., Lane, M.D. (1982) J. Biol. Chem. 257 1372-1377

200. Kuehn, L., Meyer, H., Rutschmann, M., Thamm, P. (1980) FEBS Letters 113, 189-192

201. Kurokawa, K., Lerner, R.L. (1980) Endocrinology 106, 655-662

202. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685

203. Lane, M.D. (1981) Nutr. Rev. 39, 417-425

204. Lang, U., Kahn, C.R., Chrambach, A. (1980) Endocrinology 106, 40-49

205. Lang, U., Kahn, C.R., Harrison, L.C. (1980) Biochemistry 19, 64-70

206. Larner, J. (1982) J. Cyclic Nucleotide Res. 8, 289-296

207. Le Cam, A., Freychet, P., Lenoir, P. (1975) Diabetes 24, 566-573

208. Le Marchand-Brustel, Y., Gorden, P., Flier, J.S., Kahn, C.R., Freychet, P. (1978) Diabetologia 14, 311-317

209. Levitzki, A., Willingham, M., Pastan, I. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2706-2710

210. Linsley, P.S., Blifeld, C., Wrann, M., Fox, C.F. (1979) Nature 278, 745-748

211. Livingston, J.N., Purvis, B.J. (1980) Am. J. Physiol. 238, E267-E275

212. Machicao, F., Urumow, T., Wieland, O.H. (1982) FEBS Letters 149, 96-100

213. Mäkinen, K.K. (1972) Int. J. Protein Res. 4, 21-28

214. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10153-10160

215. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1980) Endocrinology 107, 1937-1945

216. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1980) J. Clin. Invest. 66, 763-772

217. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1981) Diabetes 30, 746-753

218. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 646-653

219. Marshall, S., Green, A., Olefsky, J.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 11464-11470

220. Martins, R.N., Meager, Z., Stokes, G.B. (1981) Proc. Aust. Biochem. Soc. 14, 30

221. Massagué, J., Czech, M.P. (1980) Diabetes 29, 945-947

222. Massagué, J., Pilch, P.F., Czech, M.P. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7137-7141

223. Massagué, J., Pilch, P.F., Czech, M.P. (1981) J. Biol. Chem. 256, 3182-3190

224. Maturo, J.M., III, Hollenberg, M.D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3070-3074

225. Maturo, J.M., III, Shackelford, W.H., Hollenberg, M.D. (1978) Life Sci. 23, 2063-2072

226. Maturo, J.M., III, Hollenberg, M.D. (1979) Can. J. Biochem. 57, 497-506

227. Maxfield, F.R., Schlessinger, J., Shechter, Y., Pastan, I., Willingham, M.C. (1978) Cell 14, 805-810

228. Maxfield, F.R., Willingham, M.C., Davies, P.J.A., Pastan, I. (1979) Nature 277, 661-663

229. McCaleb, M., Donner, D.B. (1982) Biochim. Biophys. Acta 720, 147-153

230. Meyer, H.E., Bubenzer, H.-J., Herbertz, L., Kuehn, L., Reinauer, H. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 1621-1629

231. Michl, J. (1980) Am. J. Clin. Nutr. 33, 2462-2471

232. Moldéus, P., Högberg, J., Orrenius, S. (1978) Meth. Enzymol. 52, 60-71

233. Momoi, T. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 541-549

234. Mori, M., Enomoto, K., Satoh, M., Onoé, T. (1981) Exp. Cell Res. 131, 25-30

235. Mortimore, G.E., Schworer, C.M. (1977) Nature 270, 174-176

236. Mott, D.M., Howard, B.V., Bennett, P.H. (1979) J. Biol. Chem. 254, 8762-8767

237. Müller, G. (1980) Diplomarbeit, Universität Tübingen

238. Mullock, B.M., Jones, R.S., Peppard, J., Hinton, R.H. (1980) FEBS Letters 120, 278-282

239. Nichol, L.W., Smith, G.D., Ogston, A.G.(1969) Biochim. Biophys. Acta 184, 1-10

240. Olefsky, J.M., Jen, P., Reaven, G.M. (1974) Diabetes 23, 565-571

241. Olefsky, J.M., Johnson, J., Liu, F., Edwards, P., Baur, S. (1975) Diabetes 24, 801-810

242. Olefsky, J.M. (1976) Diabetes 25, 1154-1162

243. Olefsky, J.M., Reaven, G.M. (1977) Diabetes 26, 680-688

244. Olefsky, J.M., Chang, H. (1978) Diabetes 27, 946-958

245. Olefsky, J.M., Kobayashi, M., Chang, H. (1979) Diabetes 28, 460-471

246. Olmsted, J.B., Borisy, G.G. (1973) Ann. Rev. Biochem. 42, 507-540

247. Osborne, C.K., Monaco, M.E., Lippman, M.E., Kahn, C.R. (1978) Cancer Res. 38, 94-102

248. Pastan, I., Willingham, M.C. (1981) Diabetes Care 4, 33-37

249. Pastan, I., Willingham, M.C. (1981) Ann. Rev. Physiol. 43, 239-250

250. Pearse, B.M.F. (1975) J. Mol. Biol. 97, 93-98

251. Pearse, B.M.F. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1255-1259

252. Pearse, B.M.F. (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 131-134

253. Pearse, B.M.F., Bretscher, M.S. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 85-101

254. Peters, F., Pingoud, V.A. (1982) Biochim. Biophys. Acta 714, 442-447

255. Petersen, B., Beckner, S., Blecher, M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 542, 470-485

256. Peterson, G.L. (1977) Anal. Biochem. 83, 346-356

257. Pilch, P.F., Czech, M.P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3375-3381

258. Pilch, P.F., Czech, M.P. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1722-1731

259. Pilch, P.F., Shia, M.A., Benson, R.J.J., Fine, R.E. (1983) J. Cell Biol. 96, 133-138

260. Pingoud. V.A., Peters, F., Petry, M., Reckmann, B., Trautschold, I. (1982) Fresenius Z. Anal. Chem. 311, 468-469

261. Plas, C., Desbuquois, B. (1982) Biochem. J. 202, 333-341

262. Poduslo, J.F. (1981) Anal. Biochem. 114, 131-139

263. Poli, A., Gordon, P.B., Schwarze, P.E., Grinde, B., Seglen, P.O. (1981) J. Cell Sci. 48, 1-18

264. Pollet, R.J., Standaert, M.L., Haase, B.A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5828-5834

265. Pollet, R.J., Haase, B.A., Standaert, M.L. (1981) J. Biol. Chem. 256, 12118-12126

266. Pollet, R.J., Kempner, E.S., Standaert, M.L., Haase, B.A. (1982) J. Biol. Chem. 257, 894-898

267. Posner, B.I., Josefsberg, Z., Bergeron, J.J.M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 4067-4073

268. Posner, B.I., Patel, B., Verma, A.K., Bergeron, J.J.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 735-741

269. Posner, B.I., Bergeron, J.J.M., Josefsberg, Z., Khan, M.N., Khan, R.J., Patel, B.A., Sikstrom, R.A., Verma, A.K. (1980) Recent Progr. Horm. Res. 37, 539-582

270. Posner, B.I., Verma, A.K., Patel, B.A., Bergeron, J.J.M. (1982) J. Cell Biol. 93, 560-567

271. Prime, S.S., Toh, B.H. (1980) Cytobios 28, 151-160

272. Prince, M.J., Baldwin, D., Tsai, P., Olefsky, J.M. (1981) Endocrinology 109, 1754-1759

273. Quistorff, B., Bondesen, S., Grunnet, N. (1973) Biochim. Biophys. Acta 320, 503-516

274. Rechler, M.M., Podskalny, J.M. (1976) Diabetes 25, 250-255

275. Redman, C.M., Banerjee, D., Howell, K., Palade, G.E. (1975) J. Cell Biol. 66, 42-59

276. Reed, B.C., Kaufmann, S.H., Mackall, J.C., Student, A.K., Lane, M.D. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4876-4880

277. Reed, B.C., Ronnett, G.V., Lane, M.D. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2908-2912

278. Reed, B.C. (1983) J. Biol. Chem. 258, 4424-4433

279. Rennie, P., Gliemann, J. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, 824-831

280. Richman, R.A., Claus, T.H., Pilkis, S.J., Friedmann, D.L. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3589-3593

281. Ronnett, G.V., Lane, M.D.(1981) J. Biol. Chem. 256, 4704-4707

282. Ronnett, G.V., Knutson, V.P., Lane, M.D.(1982) J. Biol. Chem. 257, 4285-4291

283. Rosen, O.M., Chia, G.H., Fung, C., Rubin, C.S. (1979) J. Cell. Physiol. 99, 37-42

284. Roth, R.A. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 431-438

285. Saviolakis, G.A., Harrison, L.C., Roth, J. (1981) J. Biol. Chem. 256, 4924-4928

286. Scatchard, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672

287. Schilling, E.E., Goldenberg, H., Morré, D.J., Crane, F.L. (1979) Biochim. Biophys. Acta 555, 504-511

288. Schirmer, G. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen

289. Schlessinger, J., Shechter, Y., Willingham, M.C., Pastan, I. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2659-2663

290. Schneider, Y.-J., Tulkens, P., de Duve, C., Trouet, A. (1979) J. Cell Biol. 82, 466-474

291. Schrier, S.L., Junga, I. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 99, 58-64

292. Seglen, P.O. (1972) Exp. Cell Res. 74, 450-454

293. Seglen, P.O. (1973) Exp. Cell Res. 76, 25-30

294. Seglen, P.O. (1973) Exp. Cell Res. 82, 391-398

295. Seglen, P.O. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 44-52

296. Seglen, P.O. (1976) Meth. Cell Biol. 13, 29-83

297. Seglen, P.O., Solheim, A.E., Grinde, B., Gordon, P.B., Schwarze, P.E., Gjessing, R., Poli, A. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci. 349, 1-17

298. Shafie, S.M., Cech, J.M., Livingston, J.N., Hilf, R. (1979) Cancer Biochem. Biophys. 4, 51-57

299. Siegel, T.W., Ganguly, S., Jacobs, S., Rosen, O.M., Rubin, C.S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9266-9273

300. Silverstein, S.C., Steinman, R.M., Cohn, Z.A. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 669-722

301. Sonne, O., Gliemann, J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7449-7454

302. Steer, C.J., Ashwell, G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3008-3013

303. Steiner, D.F. (1977) Diabetes 26, 322-340

304. Stevens, R.L., Schwartz, L.B., Austen, K.F., Lohmander, L.S., Kimura, J.H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 5745-5750

305. Suzuki, K., Kono, T. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9786-9794

306. Takahashi, K. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6171-6179

307. Takahashi, K. (1977) J. Biochem. 81, 403-414

308. Tanabe, T., Pricer, W.E., Jr., Ashwell, G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 1038-1043

309. Taylor, S.I. (1975) Biochemistry 14, 2357-2361

310. Terris, S., Steiner, D.F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8389-8398

311. Terris, S., Hofmann, C., Steiner, D.F. (1979) Can. J. Biochem. 57, 459-468

312. Terris, S. (1982) Int. J. Obes. 6 (Suppl. 1), 125-130

313. Tietze, C., Schlesinger, P., Stahl, P. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 93, 1-8

314. Ungewickell, E., Branton, D. (1981) Nature 289, 420-422

315. Van Houten, M., Posner, B.I., Kopriwa, B.M., Brawer, J.R. (1980) Science 207, 1081-1083

316. Van Leuven, F., Cassiman, J.-J., Van Den Berghe, H. (1980) Cell 20, 37-43

317. Van Obberghen, E., Spooner, P.M., Kahn, C.R., Chernick, S.S., Garrison, M.M., Karlsson, F.A., Grunfeld, C. (1979) Nature 280, 500-502

318. Van Obberghen, E., Kasuga, M., Le Cam, A., Hedo, J.A., Itin, A., Harrison, L.C. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 1052-1056

319. Van Obberghen, E., Rossi, B., Kowalski, A., Gazzano, H., Ponzio, G.(1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 945-949

320. Varandani, P.T. (1973) Biochim. Biophys. Acta 304, 642-659

321. Varandani, P.T., Nafz, M.A. (1976) Diabetes 25, 173-179

322. Varandani, P.T. (1980) in "Insulin, Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormons" (Brandenburg, D., Wollmer, A., eds.) 475-482, de Gruyter, Berlin, New York

323. Varandani, P.T., Darrow, R.M., Nafz, M.N. (1982) Am. J. Physiol. 243, E140-E151

324. Verspohl, E.J., Ammon, H.P.T. (1980) J. Clin. Invest. 65, 1230-1237

325. Vigneri, R., Pliam, N.B., Cohen, D.C., Pezzino, V., Wong, K.Y., Goldfine, I.D. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8192-8197

326. Wagner, R., Rosenberg, M., Estensen, R. (1971) J. Cell Biol. 50, 804-817

327. Walaas, O., Horn, R.S.(1981) Trends Pharmacol. Sci. 2, 196-198

328. Wall, D.A., Wilson, G., Hubbard, A.L. (1980) Cell 21, 79-93

329. Wang, C.-C., Hedo, J.A., Kahn, C.R., Saunders, D.T., Thamm, P., Brandenburg, D. (1982) Diabetes 31, 1068-1076

330. Wehland, J., Willingham, M.C., Dickson, R., Pastan, I. (1981) Cell 25, 105-119

331. Wessells, N.K., Spooner, B.S., Ash, J.F., Bradley, M.O., Luduena, M.A., Taylor, E.L., Wrenn, J.T., Yamada, K.M. (1971) Science 171, 135-143

332. Whittaker, J., Hammond, V.A., Alberti, K.G.M.M. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 1100-1106

333. Williams, P.F., Turtle, J.R. (1979) Biochim. Biophys. Acta 579, 367-374

334. Willingham, M.C., Pastan, I. (1980) Cell 21, 67-77

335. Willingham. M.C., Rutherford, A.V., Gallo, M.G., Wehland, J., Dickson, R.B., Schlegel, R., Pastan, I. (1981) J. Histochem. Cytochem. 29, 1003-1013

336. Wisher, M.H., Baron, M.D., Jones, R.H., Sönksen, P.H. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 92, 492-498

337. Xiaozhou, S. (1979) Scientia Sinica 22, 565-572

338. Yeung, C.W.T., Moule, M.L., Yip, C.C. (1980) Biochemistry 19, 2196-2203

339. Yip, C.C., Yeung, C.W.T., Moule, M.L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 1743-1745

340. Yip. C.C., Yeung, C.W.T., Moule, M.L. (1980) Biochemistry 19, 70-76

341. Yip, C.C., Moule, M.L., Yeung, C.W.T. (1980) Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1671-1678

342. Yip, C.C., Moule, M.L., Yeung, C.W.T. (1982) Biochemistry 21, 2940-2945

343. Zederman, R., Grebing, C., Hall, K., Löw, H. (1980) Horm. Metab. Res. 12, 251-256

344. Zick, Y., Kasuga, M., Kahn, C.R., Roth, J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 75-80

L E B E N S L A U F

1951	Am 2. April wurde ich in Zizenhausen als Sohn des Kaufmanns Georg Klotz und der Kauffrau Luise Klotz, geb. Vogler, geboren.
1958 - 1962	Besuch der Volksschule Zizenhausen
1962 - 1970	Besuch des Gymnasiums Stockach
1970	Abitur und Beginn des Studiums der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 1972	Diplom-Vorprüfung erster Teil
September 1974	Diplom-Vorprüfung zweiter Teil
Juni 1978	mündliche Diplomhauptprüfung
September 1978 - August 1979	Diplomarbeit am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. U. Weber mit dem Thema "Photoaffinitätsmarkierung des Insulinrezeptors in Rattenleberzellen".
1979	Am 27. Juli Heirat mit der Studienreferendarin Stephanie Klotz, geb. Wizemann.
Oktober 1979 - November 1983	Arbeit an der vorliegenden Dissertation mit dem Thema "Eigenschaften des Insulinrezeptors in isolierten Rattenhepatocyten - Untersuchungen zur Struktur des Rezeptors und zur Internalisierung von Insulin und Rezeptor" in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Weber.
1982	Am 20. Juni Geburt des Sohnes Martin Klotz.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, D. Mecke, J. Guglielmi, S. Hörnle, H. Probst, U. Weber, A. Wendel, U. Weser
Organische Chemie	E. Müller, E. Bayer, H. Hagenmaier, W. Voelter
Anorganische Chemie	W. Rüdorff
Physikalische Chemie	H. Mauser, W. Zeil
Physikalische Biochemie	K. Wegmann
Physik	H. Krüger, F. Gönnenwein
Mathematik	E. Pracht
Mikrobiologie	V. Braun
Botanik	H. Metzner
Zoologie	K.G. Grell, F.-P. Möhres
Humanphysiologie	E. Betz
Anatomie	K. Mörike
Histologie	K. Mörike
Pharmakologie	H. Remmer
Medizinische Strahlenkunde	U. Feine, E. Kallee